

# 미생물을 이용한 절삭유제의 부패성능 평가에 관한 연구

홍광민 · 정근우 · 김영운 · 윤유정  
한국화학연구소 응용화학연구부

## The Study on Decomposition against Microbes of Metal-working Fluids

Kwang Min Hong · Kunwo Chung · Young-Wun Kim · Yoo Jung Yoon  
Applied Chemistry & Engineering Division, Korea Research Institute of Chemical Technology

### ABSTRACT

Synthetic water-based metal-cutting fluids are increasingly popular in the metal-working industry because of its environmental friendliness. However, the fluids have the problem to be decomposed by microbes with use. Thus, it is very important to evaluate the stabilities of the fluids against microbes for the excellent fluids. The purpose of this study is to investigate the biodegradability of several lubricating agents used to improve anti-wear property of the fluids. From the study, it was found that there existed some difference on the biodegradability against microbes such as *Escherichia coli* and *Klepsiella pneumoniae* depended on the structure of the lubricating agents and pH of the fluids.

### 1. 서 론

여러 가지 금속재료의 불필요한 부분을 제거하여 요구되는 형상으로 가공하는 금속가공분야에서, 가공능률이나 가공정밀도를 높이기 위하여 절삭유제라고 불리는 액상의 물질이 사용되고 있다. 절삭유제는 공업규격에 따라 비수용성과 수용성으로 구분되고, 현재 비수용성 절삭유제가 절삭성능과 부식방지성이 우수하여 주로 사용되고 있다. 그러나, 최근에 비수용성 절삭유제에 대하여 가공작업과정과 폐유 처리 과정에서 유독성과 환경공해상의 문제가 제기됨에 따라 각 나라마다 “환경마크” 인증제도를 실시하여 환경친화적인 수용성 절삭유의 개발과 이들의 사용이 점차 증가하고 있다. 지금까지 개발된 수용성 절삭유제는 비수용성 절삭유제에 비교하여 절삭성능이 떨어지고 작업 중에 거품이

생성되는 등 문제점이 제기되어 이들을 해결하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중에서도 절삭성능을 향상시키기 위하여 수용성 내마모 첨가제를 합성하여 첨가제로 사용하려는 연구가 주류를 이루고 있다. 수용성 내마모제로 폴리알킬렌글리콜의 지방산 에스테르[1], 폴리알킬렌글리콜 에테르[2], 폴리알킬렌글리콜과 경계윤활항상제인 지방산의 혼합물[3]인 에틸렌옥사이드와 프로필렌옥사이드의 에스테르[4], 이염기산의 모노에스테르[5], 히드록시스테아린산의 에스테르[6] 등이 있고, 이들을 첨가한 절삭유제의 절삭성능에 관한 논문이 최근에 발표되고 있다. 그러나, 수용성 내마모제와 경계 윤활 특성을 향상시키기 위한 첨가제등의 미생물에 의한 부패능에 관한 연구 논문은 거의 발표된 바 없다. 또한, 절삭유제의 부패액에서 출현하는 주요 미생물은 *Escherichia coli* (*E. coli*),

*Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Paracolobactrum* sp, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Pseudomonas oleovarans* (*P. oleovarans*), *Proteus vulgaris* 등의 호기성 균임이 밝혀졌다[7]. 따라서 본 연구에서는 위에서 언급한 여러 가지 호기성 균중에서 절삭유제의 부패에 가장 영향을 많이 미치는 *E. coli* 와 *K. pneumoniae* 균을 사용하여 폴리에틸렌글리콜 (PEG), 지방산 에스테르 및 절삭유제 (비교 대상으로 A사의 부패 방지제가 처방되지 않은 제품)의 부패능을 고찰하여 절삭유의 부패 평가 방법을 확립하고자 하였다.

## 2. 실험

부패 평가 방법을 확립하기 위하여 중요한 것은 부패실험에 사용하는 호기성 균을 일정하게 접종하는 것이다. 접종되는 미생물의 수를 조절하기 위하여 각 미생물이 어떻게 성장하는지를 관찰하였다. 먼저 전체적인 부패 실험과정을 살펴보면 다음과 같다[8].

1. Nutrient Broth(8g/L in D.W)를 121 °C의 멸균기에서 15 분 동안 멸균한다.
2. 50 mL의 멸균된 Broth에 보관중인 Colony를 접종하여 37 °C의 shake 항온조에서 24시간동안 배양한다 (Overnight Culture).
3. 50mL 새 멸균 Broth에 600 nm의 파장에서 OD (Optical Density)값이 0.19가 되도록 2번 액을 접종하여 시간에 따른 OD값을 측정한다 (균의 대수성장기 조사).
4. 1~3의 과정을 반복하여 37 °C shake 항온조에서 대수성장기까지 균을 배양한다 (Subculture).
5. 균이 배양된 Broth를 2000 rpm에서 10 분 동안 원심 분리하여 균이 뭉친 pellet을 분리한다. 이 pellet을 냉장 보관된 sodium

phosphate 완충용액 (25 mL)으로 용해하여 다시 원심 분리한다.

6. 원심 분리하여 분리된 pellet을 완충용액으로 다시 용해하여 OD값이 0.5가 되도록 조절한다.

7. OD값이 조절된 균액을 petri dish에 배양하여 미생물 수를 count한다. 별도의 실험으로 균액을 시험 유제에 접종하여 시간에 따른 균수를 측정하므로써 각 시료의 미생물에 대한 부패도를 평가한다.

### 2.1 미생물의 성장 곡선 실험 (Growth Curve Test)

미생물의 성장기는 4단계(유도기-대수성장기-감소성장기-내생성장기)로 구분되는데 각 단계마다 균의 특성이 다르므로 같은 상태의 균을 선택한다는 것은 실험의 재현성을 위해서 아주 중요한 실험이다[9]. 성장곡선을 통하여 균의 생명주기 중에서 균수가 급격히 증가하는 시기인 대수성장기 (Log phase)를 선택한다. 이때는 복잡한 체내의 효소반응에 의해 세포내부의 합성속도가 빨라지므로 세포분열이 왕성해져 번식률이 최대치로 된다. 미생물의 성장번식에 따라 이에 영양원을 필요하게 된다. 이런 상태의 균을 접종하여야 새로운 환경에 대한 적응성이 강하고 빠른 시간 내에 유제를 부패시킬 수 있게 된다. 미생물의 성장속도를 살펴보기 위하여 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. oleovarans* 균주를 영양배지에서 배양하여 Petri Dish의 Colony 상태로 냉장보관 하였다가 멸균되어 있는 Broth에 접종하여 37 °C에서 24시간동안 배양한 후 (Overnight Culture), 새로운 Broth에 일정농도 (600 nm에서 Optical Density ≒ 0.19)를 접종하여 배양하면서 배양 시간별로 분광기를 이용하여 OD값을 측정하고 배양시간에 따른 OD값과의 상관관계 그래프를 그린다. 그래프를 통하여 얻은 대수성장기의 균을 부패 실험에

적용하였다.

## 2.2 접종액의 균수 조절 실험 (Inoculum Control Test) 및 질산염의 부패성능 실험

2.1에서와 같이 균을 대수성장기까지 2차 배양(Subculture)을 행한다. 그 후, Broth를 원심분리기 (2000 rpm, 10 min)로 분리하여 분리된 pellet을 sodium phosphate 완충용액 (10 mM)으로 용해시킨 후 반복하여 원심분리하고 완충용액으로 OD값을 일정하게 조절한다 (약 0.5). 이 방법은 미생물의 농도가 높을 수록 그 액이 탁하여지고 이로 인해 이에 따른 흡광도가 증가함을 이용하여 균수를 조절하는 방법이다. 먼저 접종액의 균수를 알기 위해 조절된 액을  $10^n$  ( $n=0\sim10$ )배율로 희석하여 Petri Dish에 도말하고 37 °C에서 48 시간동안 배양기에서 배양하여 생긴 Colony를 Count하여 접종액의 균수를 파악한다 (Petri Dish에 배양된 Colony수는 30~300개의 것을 유효한 것으로 선택하여 계산한다). 균수가 조절된 균을 대상유제에 일정 농도로 접종한 후 시간에 따라 Petri Dish에 배양하고 생긴 Colony 수를 비교함으로써 유제의 부패정도를 측정한다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 미생물의 성장 곡선 실험 (Growth Curve Test) 결과

*E. coli* 및 *K. pneumoniae* 균을 사용하여 2. 실험에서 서술한 1~3의 실험과정을 통하여 배양시간에 따른 OD값을 측정한 결과 다음 Fig. 1과 같았다. Fig. 1에서와 같이 배양 시간에 따른 *E. coli*의 OD값은 완만하게 증가하여 배양 4시간 이후에 거의 일정하게 유지되었고, *K. pneumoniae*의 OD값은 배양 5시간까지 거의 선형적으로 증가 하였고 *E. coli*균에 비해 2.5배의 OD값을 나타내었다.

배양 5시간 이후부터 OD값이 일정하게 유지되어 감소 성장기로 진입함을 알 수 있었다. 이와 같은 결과로부터 *K. pneumoniae*가 *E. coli*보다 성장속도가 빠르고 대수성장기도 길게 나타남을 알 수 있었다.

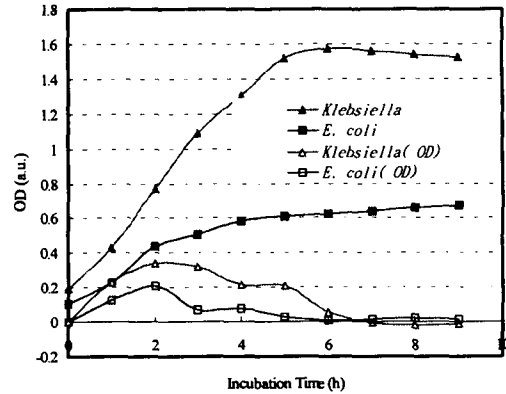


Fig. 1. Growth curve graphs of *E. coli* and *K. pneumoniae*.

또한, 균의 종류에 따라 최고 대수성장기 (max  $\Delta$ OD)도 다르게 관찰된다. 최고 대수 성장시간대를 찾기 위하여 Fig. 1에서 시간에 따른 균의 성장폭의 차이를 나타내는  $\Delta$  OD값을 구하여 보면, *E. coli*의 경우는 배양 후 2시간대, *K. pneumoniae*의 경우는 3시간대로 나타났다. 따라서 접종액의 균수 조절 실험에서 Overnight culture 후 Subculture 시간을 *E. coli*는 2시간, *K. pneumoniae*는 3시간으로 하여 가장 활동적인 상태의 균을 원심분리를 통하여 얻은 후, 본 실험에 접종액으로 사용하였다. Subculture는 Overnight culture에 비하여 상당히 중요하다. Overnight culture는 일정하게 Colony를 취하지 않아도 24시간 동안 충분히 배양되면 Broth의 균들은 증식과 사멸을 반복하므로 더 자라지않고 일정수준에서 머물러 있기 때문이다. 그러나 Subculture는 정확한 OD값과 최고 대수 성장기를 맞추지 않으면 균의 양과 상태가 달라지므로 결과 값에 많은 오

차를 줄 수 있다. Fig. 2를 보면 상술한 Subculture의 중요성을 알 수 있다.

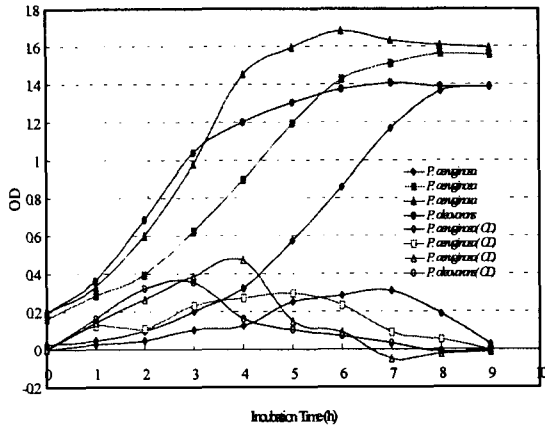


Fig. 2. Growth curve of *P.aeruginosa* and *P. oleovarans*.

*P. aeruginosa* 균의 성장곡선은 Subculture 시 접종균의 OD값의 차이에 따라 성장패턴이 크게 달라져서 OD값이 클수록 미생물 성장속도와 대수성장기가 빨라짐을 알 수 있다. 초기 배양 균수가 많아 OD값이 크면 대수성장시에 세포분열로 인하여 균수가 배가적으로 증가하고 OD값도 균수에 정비례적으로 높아진다. 한편, *P. oleovarans*의 성장곡선은 *P. aeruginosa*의 패턴과 비슷하였으나 대수성장기와 감소성장기가 빨라짐을 알 수 있었다. 즉, 미생물 균종에 따라 각기 다른 성장 곡선 특성을 보여주고 있다.

### 3.2 접종액의 균수 조절 실험 (Inoculum Control Test)결과 및 부패평가 실험 결과

*E. coli*와 *K. pneumoniae*의 균을 사용하여 대수 성장기까지 배양한 후 균수를 조절한 결과 Table 1과 같았다. Table 1에서 보는 바와 같이 *E. coli*균은  $4.4 \sim 10.0 \times 10^5$  CFU/mL의 범위를 나타내었으며 *K. pneumoniae* 균은  $1.8 \sim 9.5 \times 10^7$  CFU/mL이었다. *K. pneumoniae*균이 *E. coli*에 비해

$10^2$ 배 많음을 알 수 있고 이 결과는 미생물 성장곡선 실험에서 OD값의 차이와 같은 현상으로 해석할 수 있다.

Table 1. Colony Count of Inoculum

균 종류 \ 실험횟수	1	2	3
<i>E. coli</i> ( $\times 10^5$ )	5.5	4.4	10.0
<i>K. pneumoniae</i> ( $\times 10^7$ )	9.5	1.8	4.7

또한, *E. coli*와 *K. pneumoniae* 균의 접종액의 OD값은 약 0.5로 같지만 균수는 현저한 차이를 보이고 있다. 즉, 균종에 따라 흡광정도가 다를 수 있었다. 이상의 결과로부터 CFU(Colony forming units)가 조절되어 그 균수를 알고 있는 접종액 (*E. coli*와 *K. pneumoniae*)을 실험 대상 유제인 PEG 600 50 wt% 수용액(이하 P6라 약함, pH 7.22), PEG-Ester 50 wt % 수용액(이하 P6A라 약함, PEG 600과 아디프산을 반응하여 합성, pH3.31) 및 A사의 절삭유제(부패 방지제를 처방하지 않음, pH 9.93)에 접종하여 부패능 실험을 행하였다.

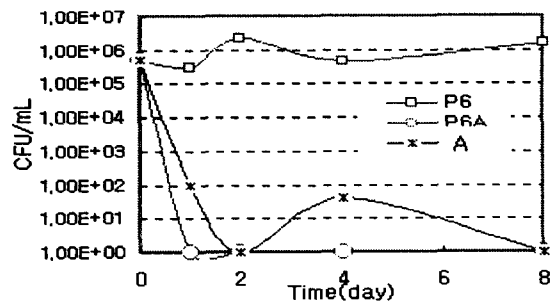


Fig. 3. Decomposition with *E. coli* (not adjusted pH).

각 유제의 pH를 조절하지 않고 *E. coli*균에

의한 부패능 실험결과, 다음 Fig. 3과 같이 유제의 pH가 산성인 P6A와 pH가 9.93인 B사의 유제는 균이 적응하지 못하여 부패가 일어나지 않음을 알 수 있다. pH가 중성인 P6는 부패시간이 경과하여도 균수는 거의 일정하게 유지되는데 이는 P6가 *E. coli*균의 발육을 억제하지 않고 오히려 영양의 공급원으로 작용하고 있다고 보이며 시간이 경과할수록 부패가 일어나리라 예측 할 수 있다. Fig. 3으로부터 미생물의 성장에 직접적으로 pH가 영향을 미치고 있는 것을 알 수 있다. 즉, 균의 성장은 pH 6~8에서 잘 자란다고 알려져 있으며 모든 미생물은 발육이 가능한 pH범위를 가지는 데 가장 적당한 pH농도 조건을 최적 pH (Optimal pH)라고 한다[9]. P6A와 A사의 유제는 균 성장에 부적당한 산성과 염기성이므로 성장이 거의 되지 못하고 사멸됨을 알 수 있다. 따라서 절삭유를 사용하는 현장에서도 유제의 pH가 떨어지지 않게 유지하는 것이 그 사용수명을 연장할 수 있는 방법일 것이다. 그러나 pH가 떨어지는 이유 역시 부패로 인해 생성되는 부산물에 기인되므로 결국 미생물에 안정하여 부패가 잘되지 않는 유제를 사용하는 것이 중요하다.

다음 실험으로 pH의 영향을 배제하여 유제의 구조적 차이에 의한 부패능을 평가하기 위하여 pH를 미생물 배양이 잘되는 P6A는 7.25로 A사 유제는 7.24인 중성조건으로 조절하여 *K. pneumoniae*에 의한 부패능을 실험하였다. 그 결과, 각 균이 Fig. 4에서와 같이 각 유제에 잘 적응하며 변하여 가는 것을 알 수 있다. 특히 pH를 조절하지 않았을 때와 다르게 P6A는 일정 수준까지 균이 증가된 후 일정하게 유지되면서 부패가 진행되고 P6와 A유제는 조금은 감소하는 경향이 있으나 시간이 지날수록 일정 수준을 유지하며 유제를 분해한다. 그러나, 시간이 지날수록 P6A 유제는 P6 및 A유제에 비해 부패

의 차이가 두드러지게 나타나리라 예측된다.

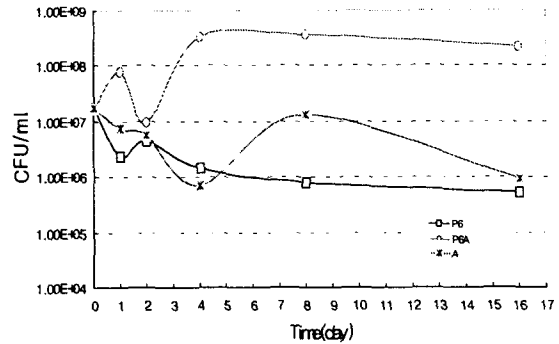


Fig. 4. Decomposition with *K. pneumoniae* (adjusted pH).

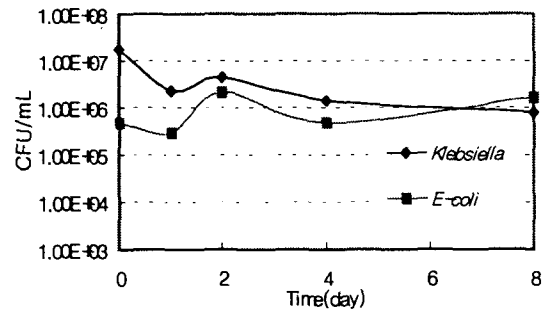


Fig. 5. Decomposition of P6 with *E. coli* and *K. pneumoniae*.

같은 유제에 대한 두 균의 성장정도를 비교하기 위해 pH를 조절하지 않아도 중성인 P6유제의 경우 *E. coli*와 *K. pneumoniae*의 성장 유형이 거의 유사함을 알 수 있다 (Fig. 5). 즉, 초기 접종균의 균수는 다르지만 결국에는 그 수가 서로 일정하게 유지되고 있다. 이 상태는 균이 성장 및 사멸을 반복하면서 영양원을 이용하며 스스로 내성과 적응 환경을 유제로부터 얻어 미생물의 대사 작용에 사용하므로 그 유제가 점차 분해되어 간다. 또한, 균수가 시간에 따라 같은 유형으로 변해감을 알 수 있는데 이것은 각 균이

부패에 작용하는 패턴이 같음을 의미하는 것이다. 즉, 구조적으로 약한 부분에 먼저 균이 작용하여 분해함을 알 수 있었다.

#### 4. 결론

절삭유제의 미생물에 대한 부패능을 평가하기 위하여 미생물의 성장패턴을 조사하고 조절된 균을 유제에 접종하여 부패능을 실험한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 미생물의 성장곡선 실험 결과 *E. coli* 균의 대수 성장기는 배양 후 2시간, *K. pneumoniae* 3시간, *P. aeruginosa* 4시간, *P. oleovorans* 3시간으로 균의 종류에 따라 다르게 나타났다.
2. OD값을 0.5로 조절한 접종액의 *E. coli* 균수는  $4.4 \sim 10.0 \times 10^5$  CFU/mL, *K. pneumoniae* 균수는  $1.8 \sim 9.5 \times 10^7$  CFU/mL 이었다.
3. 미생물의 부패에 대한 pH의 영향을 살펴본 결과, 중성의 pH (6-8)에서 부패가 왕성하게 진행되고 산성과 염기의 pH 상태에서는 균이 성장하지 못함을 알 수 있었다.
4. 동일한 pH (중성)에서 부패능 실험 결과, 내마모제의 구조에 따라 부패능의 차이를 나타내어 에스테르형 내마모제가 에틸렌글리콜계 내마모제 보다 부패가 빨리 진행되었다.

이상의 연구 결과에서 절삭유제에 사용되는 내마모제의 부패능을 변별력있게 평가할 수 있었으며 평가를 토대로 미생물에 안정한 유제의 개발을 유도하여 앞으로 사람과 환경에 유해하지 않는 환경 친화적인 절삭유 유제 개발에 도움이 될 것으로 생각된다.

#### 참 고 문 헌

1. B. L. Riddle and E. M. Kipp, *Lub. Eng.*,

Vol. 47, No. 12, pp991, 1991.

2. A. D. Schottenberg, European Patent 183, 050, 1986.

3. W. Yong, X. Qunji, and C. Lili, *J. of Synthetic Lubrication*, Vol. 13, No. and C. Lili, Vol. 13, No. 4, pp375, 1997.

4. N. M. Canter, J. J. Chaloupka, and G. J. Fischesser, *Lub. Eng.*, Vol. 44, No. 3, pp 257-261, 1987.

5. S. Watanabe, H. Nakagawa, and Y. Ohmori, *Tribologist*, Vol. 42, No. 1, pp 81-84, 1997.

6. H. Nakagawa, Y. Ohmori, S. Watanabe, T. Fujita, and M. Sakamoto, *Tribologist*, Vol. 43, No. 5, pp436-439, 1997.

7., 韓國油畫試驗檢査所, "切削乳劑와研削乳劑". pp228.

8. W. M. shafer "Radial Diffusion Assay". pp175, 3.1.

9. 金武植 外5, "環境微生物學", 東宗社. pp97, pp170-171.