

## 환경인자가 윤활제품의 생분해도 시험에 미치는 영향

조은혜 · 박근형 · <sup>1</sup>한승욱 · <sup>1</sup>김의용 · <sup>2</sup>류재상 · <sup>2</sup>장순복 · <sup>2</sup>이운기 · †채희정  
호서대학교 식품생물공학과 및 식품기능안전연구센터<sup>1</sup>서울시립대학교 화학공학과 <sup>2</sup>한국화학시험연구원  
(접수 : 2008. 2. 14., 게재승인 : 2008. 7. 15.)

## The Effects of Environmental Factors on Biodegradability Test for Lubricant Products

Eunhye CHO, Keunhyoung PARK, Eui Yong KIM<sup>1</sup>, Jae Sang RYU<sup>2</sup>, Sun Bok JANG<sup>2</sup>,  
Un Gi LEE<sup>2</sup>, and Hee Jeong CHAE<sup>†</sup>

Dept. of Food and Biotechnology, and Center for Function and Safety, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

<sup>1</sup>Dept. of Chemical Engineering, The University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

<sup>2</sup>Korea Testing and Research Institute, Seoul 150-038, Korea

(Received : 2008. 2. 14., Accepted : 2008. 7. 15.)

Various methods (OECD 301B, ISO 9439 and ASTM 5864) for biodegradability test of lubricants were reviewed, and a standard procedure was developed. Most lubrication products are released in rivers or sea then is degraded by microbial action in aerobic condition. Most international method are based on CO<sub>2</sub> evolution test. Inoculum obtained from a sewage disposal plant and test compound are cultivated in a mineral medium. Organic carbon of the test compound is degraded and oxidized through the enzymatic actions of inoculum, and ultimately mineralized to carbon dioxide. Biodegradability test conditions of lubricant oils were optimized. The highest biodegradability was achieved when the same medium as in ASTM 5864 and inoculum concentration of 10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup> cell/L were used. The optimum standard materials were selected as aniline and sodium acetate. Additionally the effects of inoculum type on microbial growth and biodegradability were examined. Finally the standard operating procedure (SOP) for biodegradability test method was proposed.

**Key Words** : Biodegradability, lubricant

### 서론

윤활제품은 사용 중 또는 사용 후 폐기과정에서 누유 되어 하천, 해양 및 지하수에 대한 오염을 유발시키는데 특히 식수원이 되는 하천 및 지하수의 오염이 심각하다. 윤활제품의 수요와 생산이 증가하면서 생태계에 대한 위해성 평가의 중요성이 증대되고 있다. 유럽에서는 환경오염 문제의 심각성을 고려하여 석유계 윤활유의 사용을 제한하기 시작하였다. 유럽의 경우 550만톤의 사용 윤활유 중 약 20% (110만톤)가 생태계에서 유출되어 오염문제를 유발하므로 석유계 윤활유를 대체하려는 친환경성 생분해 윤활유의 개발에 많은 노력을 기울이고 있다(1). 국내의 경우 좁은 국토와 많은 차량, 열악

한 수거 시스템에도 불구하고 환경보존에 대한 관심의 증대에 따라 최근 들어 일부 윤활유 제조회사에서는 고급 자동차를 위한 판매 전략의 일환으로 적지 않은 양의 친환경성 윤활유 베이스를 수입하여 첨가제로 사용하고 있다. 국내에서 생분해성 윤활유 생산과 관련하여 사업이 진행되어 펜타에리스리톨계 생분해성 윤활유 생산을 준비 중에 있다. 생분해성 윤활유 국내 시장현황을 보면 환경에 대한 사회의 관심이 높아짐에 따라 대기업, 공기업을 중심으로 생분해성 윤활유에 대한 수요가 증가되어 연간 20%의 매출신장이 이루어지고 있는 실정이다(7).

윤활제품은 대부분 하천이나 해양에서 유출되어 호기적인 환경에서 미생물 작용에 의해 분해된다. 국외규격 중 윤활유의 생분해도 평가에 적용 가능한 규격으로는 OECD 301B(2), ISO 9439(3), ASTM D 5864(4) 등이 있다. 이 규격들은 주로 호기적 조건으로 미생물이 생분해성 물질을 분해하는데 소요되는 이산화탄소의 양으로 생분해도를 결정한다. 불용성 물질을 취급할 수 있고, 시험에 있어서 산소의 양이 제한인자가 되지 않으며, 포집기를 자주 적정해주기 때문에 28일 동안

† Corresponding Author : Dept. of Food and Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

Tel : +82-, Fax : +82-

E-mail :

생분해도를 측정할 수 있으며 이에 따라 주어진 기간 내에 생분해도 그래프를 작성할 수 있는 장점을 가지고 있다(5). 이처럼 오일류의 생분해도 시험 관련 외국규격 중 현재 가장 일반적으로 받아들여지고 있는 방법은 주로 CO<sub>2</sub> evolution test 를 근간으로 하고 있는 시험이다.

국내에 유기화합물의 생분해도 시험 방법으로는 토양 속에서의 생분해를 측정하는 방법, 곰팡이나 세균을 이용한 방법 및 분리 정제된 효소를 이용하는 방법이 있다(8-9). 토양 속에서의 생분해를 측정하는 방법은 실제 조건에 가깝지만 여러 가지 복합적인 이유로 인하여 재현성이 낮은 방법이다. 곰팡이나 세균을 이용한 방법은 일정 기간 동안 배양시킨 미생물의 세포 성장에 의해 발생된 이산화탄소 (CO<sub>2</sub>)를 측정하여 정량화 시키는 것으로 재현성이 있는 방법이다. 분리 정제된 효소를 이용한 방법으로 생분해도 시험을 더욱 빨리 진행시킬 수 있으며 생분해에 대한 포괄적인 연구를 할 수 있다. 그러나 국내에는 유통제품에 대한 생분해도 시험 규격이 존재하지 않는 실정이다.

본 연구에서는 생분해성 유통유의 품질 평가에서 가장 중요한 지표인 수질 속에서의 생분해성 평가를 위한 국제 규격인 OECD 301B, ISO 9439, ASTM 5864간의 시험조건을 비교 검토하여 시험조건을 최적화하기 위한 실험조건을 설정하였다. 또한 결과의 유효성 확인을 위한 밸리데이션을 작성 하였다.

재료 및 방법

재료 및 장치

생분해성 유통유 베이스는 (주)한국하우톤, (주)광우파카, (주)범우화학으로부터 제공받아 사용하였다. 생분해도 측정을 위한 미생물 접종원 (inoculum)은 한국화학시험연구원의 표준 활성슬러지, 천안시 환경사업소 폐수처리장의 활성오니 (activated sludge)를 제공받아 사용하였다. 검토한 국내의 규격 중 본 연구에서 분석 절차로 채택한 규격에 근거한 생분해도 분석장치의 개략적인 표시는 Fig. 1과 같다. 생분해도 실험을 위해 암실 조건에서 온도조절이 가능한 수욕조 (181.5cm×55cm)를 아크릴 (0.1 mm)로 제작하였다. 투명한 아크릴을 사용하여 시험용기 안 마그네틱바 (magnetic bar)가 교반되는지 확인할 수 있도록 하였다. 공기압축기 (air compressor)를 통하여 로타미터 (rotameter)의 공기 유속량을 시험용기내 배지 1 L당 20~40 mL/min의 속도로 조절 하였다.

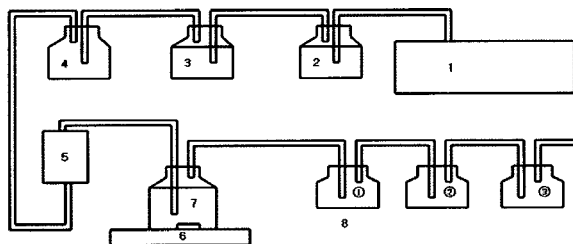


Figure 1. Schematic diagram of the equipment for aerobic and aquatic biodegradation test (1.air compressor, 2.CO<sub>2</sub> trap, 3.CO<sub>2</sub> indicatar, 4.naught vessel, 5.air floe meter, 6.magnetic stirrar, 7.test vessel).

두 개의 10 N 수산화나트륨 (NaOH)을 통하여 유입된 공기

중에 포함되는 이산화탄소를 포집한 후 0.0125 M 수산화바륨 (Ba(OH)<sub>2</sub>)용액을 포화된 이산화탄소의 상태를 표시하는 지시약으로 사용하였다. 시험용기에서 발생된 이산화탄소를 3개의 포집병에 0.0125 M 수산화바륨용액을 넣어서 직렬로 연결하였고, 시험용기와 각각의 포집병을 연결하는 고무관은 스테인레스관을 사용하여 단단히 고정 시켰다. 이때의 병마개에는 실리콘 마개의 직경보다 좁은 구멍을 뚫어 이산화탄소의 방출을 최소화하였다. 시험용기에 분석시료와 미생물 접종원을 넣고 28일 동안 생분해도 시험을 수행하였다.

시험배지

생분해도 시험을 위한 최소배지 (meneral media)의 조성은 다음과 같다. Stock solution (a) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8.5 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 21.75 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 33.4 g/L, HN<sub>4</sub>Cl 1.7 g/L, Stock solution (b) CaCl<sub>2</sub> 27.5 g/L, Stock solution (c) CaCl<sub>2</sub> 27.5 g/L, Stock solution (d) FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.25 g/L, Stock solution (e) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40 g/L를 제조하여 Stock solution (a)를 10 mL/L, Stock solution (b), (c)와 (e)는 1 mL/L, Stock solution (d)는 4 mL/L씩 시험용기 (test vessel)에 넣고, pH7.4로 조절하여 실험을 하였다(4).

접종원

접종원은 세 가지를 사용하였다. 첫 번째로 가정 하수를 주로 처리하는 하수 처리장 (천안환경사업소)에 있는 폭기조에서 샘플을 채취하였다. 채취한 샘플은 체 (2~3 mm)를 통해 여과하여 침전된 슬러지를 여과지 (Whatman CF/C, 47 mm)로 여과 하였다. 여과된 슬러지를 건조오븐에서 105~110℃에서 2시간 건조시킨 후 최종 부유물질 (suspended solid, SS)의 농도가 30 mg/L가 되도록 시험배지로 희석하였다. 두 번째로 지표수에서 얻은 접종원은 호수나 강 등에서 지표수의 샘플을 채취 하였다. 지표수에 부유물질이 많을 경우 여과하여 최종 부유물질의 농도가 30 mg/L 이하가 되도록 시험배지로 희석하여 사용하였다. 하수처리장에 있는 폭기조에서 얻은 접종원과 지표수에서 얻은 접종원은 호기성 상태를 유지하고 가급적 수집된 당일 사용한다.

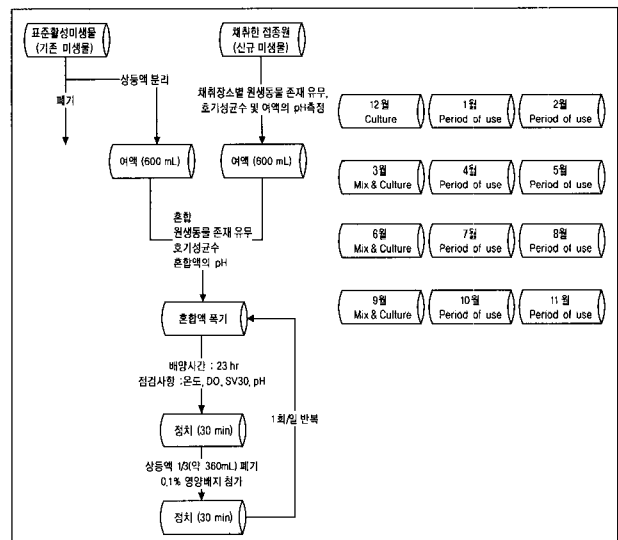


Figure 2. Schematic diagram for making of activated sludge.

세 번째로 표준활성슬러지는 하수처리장 4지점, 강 3지점, 내해 2지점, 호수 1지점 등 10지점에서 샘플을 채취하였다. 하수처리장의 활성슬러지는 하루 동안 폭기하며, 그 외는 4℃ 이하 어두운 곳에서 하루 동안 보관하였다. 표준활성슬러지의 조제는 Fig. 2와 같다. 접종원으로 사용하기 위해서는 배양 조작이 완결된 후 18~24시간 이후에 채취하고, 본 시험 24시간 전 이산화탄소제거장치를 거친 CO<sub>2</sub>-free air로 약 24시간 폭기하여 사정조정 (pre-conditioning)하였다.

**분석시료 및 대조군**

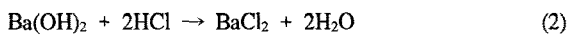
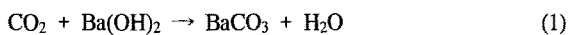
본 실험에서의 분석대상 물질인 생분해성 윤활유는 유기탄소 농도를 30 mg/L가 되도록 칭량하였다. 동일 분석시료를 2개의 시험용기에 각각 넣었다. 생분해성이 높은 것으로 알려져 있는 물질을 이용하여 분석절차대조군 (procedure control)으로 사용하는 것이 일반적이는데, 본 실험에서는 대조군으로 aniline을 사용하였다. 독성대조군 (toxicity control)으로서 분석물질과 함께 aniline을 넣고 시험하였다(table 1). 시험물질과 접종원을 첨가한 뒤 총 부피는 배지를 첨가하여 1.2 L가 되도록 조정하였다. 시험화합물 및 표준물질은 미량이 첨가되므로 총 부피에서 무시하였다.

**Table 1.** Vessels for biodegradability test

| Vessel                      | Mineral medium | Test compound | Reference compound | Inoculum |
|-----------------------------|----------------|---------------|--------------------|----------|
| Test                        | ○              | ○             |                    | ○        |
| Blank (inoculum blank)      | ○              |               |                    | ○        |
| Procedure control           | ○              |               | ○                  | ○        |
| Toxicity control (optional) | ○              | ○             | ○                  | ○        |
| Abiotic control (optional)  | ○ (sterilised) | ○             |                    |          |

**이산화탄소의 정량**

공기압축기로부터 발생한 공기를 유입시켜 최소배지에 분석시료와 접종원을 넣고 28일간 배양하며 발생된 이산화탄소를 0.0125 M Ba(OH)<sub>2</sub>이 100 mL씩 담겨진 직렬로 연결된 3개의 포집병에 포집하였다. 시험기간 중 일정시간 간격으로 배양기에서 가장 가까운 순서로 포집병을 제거한 후 포집병에 1% phenolphthalein 2~3방울 떨어뜨렸다. 적정에 소요되는 HCl (0.05 M)의 부피로 흡수된 이산화탄소의 양을 정량하였다. 발생된 이산화탄소의 양은 이산화탄소와 반응하고 남은 수산화바륨[식 (1)~(2)]을 기저 농도의 HCl 용액으로 적정함으로써 [식 (3)~(5)]의 과정을 거쳐 계산된다.



$$\begin{aligned} \text{CO}_2 \text{ 생성량 (mmol)} &= \text{수산화바륨 반응량 (mmol)} \quad (3) \\ &= 0.0125 \times 100 - \frac{0.05 V_{HCl}}{2} \\ &= \frac{0.05 (50 - V_{HCl})}{2} \end{aligned}$$

$$\text{CO}_2 \text{ 생성량 (mg)} = \frac{0.05 (50 - V_{HCl})}{2} \times 44 \quad (4)$$

$$= 1.1 \times (50 - V_{HCl})$$

$$\text{ThCO}_2 = C_{test} \times V_L \times \frac{44}{12} \text{ (mg)} \quad (5)$$

여기에서, C<sub>test</sub> : 시험용기 내에서 시험화합물의 유기탄소 농도 (mg/L)

V<sub>L</sub> : 시험용액의 부피(L)

44, 12 : CO<sub>2</sub>의 분자량 및 탄소(C)의 원자량

**생분해도 계산**

적정 간격 당 시험용기에 대해 각각 생분해도 (D<sub>test</sub>)는 다음과 같이 계산하였다[식 (6)].

$$D_{test} = \frac{\sum \text{CO}_2^{test} - \sum \text{CO}_2^{blank}}{\text{ThCO}_2} \times 100 \text{ (\%)} \quad (6)$$

여기에서, D<sub>test</sub> : 생분해도

∑CO<sub>2</sub><sup>test</sup> : 시험시작 후 t시간 동안 시험용기 안에서 방출된 이산화탄소의 누적량(mg)

∑CO<sub>2</sub><sup>blank</sup> : 시험시작 후 t시간 동안 바탕시험에서 방출된 이산화탄소의 누적량(mg)

**결과 및 고찰**

**국내외 규격 검토**

이생분해도 관련 국제 규격인 OECD 301B, ISO 9439, ASTM 5864의 시험조건을 미생물농도, 배지, 시험물질 농도 및 조건, 표준물질, 시험용기, 이산화탄소 제거 및 통기장치, 측정 시간 및 주기 또는 결과의 유효성 확인 (validation) 항목에 대하여 비교하였고, 이 시험조건을 최적화하기 위한 실험조건을 설정하였다.

**배지 조성별 생분해도 시험**

배지 조성에 따른 생분해도를 평가하기 위하여 제시된 (ASTM 5864, ISO 9439) 두 가지 무기염 배지에 대한 비교 실험을 하였다. 본 시험에서는 균수 10<sup>4</sup> CFU/mL, SS 20 mg/L, 시험물질의 유기탄소 농도를 15 mg/L로 고정하여 배지의 조성을 변수로 하여 실험하였다.

초기 생분해도는 미생물 활동의 결과로, 무기화가 아닌 시험화합물이 구조적 변화를 일으킬 때의 분해 수준이라 하며 이 시기를 준비기 (lag phase)라고 한다. 미생물이 유기물에서 적응하게 되면 급격하게 생분해를 일으키며 이를 생분해기 (degradation phase)라고 한다. 분석말기에는 생분해가 일어나지 않는 상태 (maximum level of degradation), 즉 이산화탄소, 물, 무기염 및 새로운 미생물 세포 구성 물질이 생산되는 시기에 도달한다. 이 상태는 시험화합물이 미생물에 의해 완전히 사용되었을 때의 분해 수준이라 말한다. 이 생분해 최고점을 지난 시기를 정체기 (plateau phase)라고 한다(3).

Fig 3에서 보는바와 같이 24일 이후 ASTM 5864의 배지

는 ISO 9439의 배지보다 5% 정도 높은 생분해도를 보였으나 생분해도 평가에 있어 어느 조성이 좋다고 판단할 수는 없었다. 그러나 ASTM 5864에서 제시한 배지에는 ammonium sulfate  $[(NH_4)_2SO_4]$ 와 ammonium chloride가 첨가되어 있어 ISO 9439 배지보다 질소함량이 높기 때문에 균의 성장의 영향을 받아 생분해가 잘 일어난다고 판단된다. 따라서 ASTM 5864에서 제시한 배지는 시험 화합물의 유기탄소의 농도가 높을 때와 접종물의 SS가 높을 때 사용하는 것이 적합하다고 사료된다.

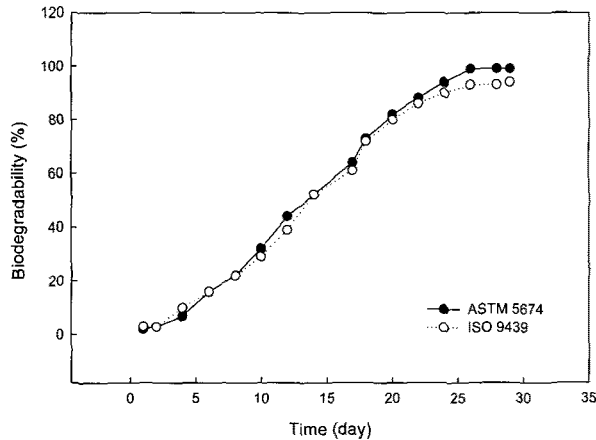


Figure 3. Biodegradability of a lubricant oil determined by different types of media.

독성 테스트 생분해도 시험

시험 화합물의 독성에 대한 실험을 하기 위하여 표준물질과 시험 화합물의 총 유기탄소 농도를 20 mg/L 되게 하여 생분해도를 평가 하였다(Fig 4). 만약 시험물질에 대해 독성이 있다면 생분해도의 저해 요소로 작용하게 되므로 시험 평가 방법에 있어 적당하지 않다. TOC 15 mg/L, Test medium ASTM 5864, 접종원의 미생물 농도를  $2.3 \times 10^5$  CFU/mL, SS 20 mg/L이고 표준물질로는 aniline을 시험물질로는 A사, B사, C사의 윤활유를 가지고서 실험을 하였다. 실험결과 28일 지난 후 생분해도가 A사와 B사, C사 모두 60% 이상으로 표준물질에 대한 독성 및 저해요소가 없는 것으로 판단되었다.

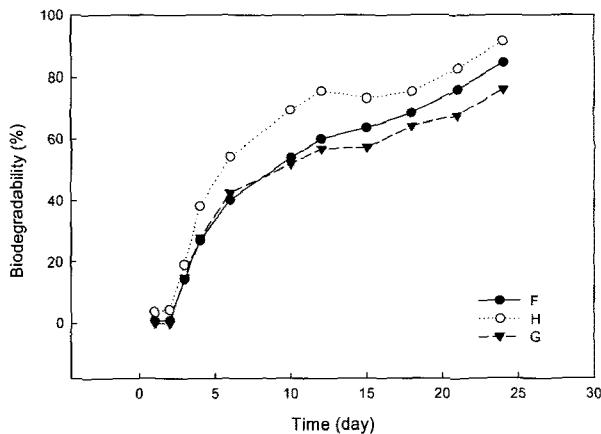


Figure 4. Biodegradability of various lubricant oils determined.

미생물 농도별 생분해도 시험

접종원의 미생물 농도별 윤활유 시료의 생분해도를 평가

하기 위하여 ASTM 5864 배지를 사용하였고, 접종원의 미생물 농도를  $10^2 \sim 10^5$  CFU/mL로 변화를 주어 생분해도 시험을 하였다. 사용한 접종원은 표준활성슬러지로 최종 시험과 같은 조건으로 7일간의 사전조정을 거친 접종원을 이용하였다.

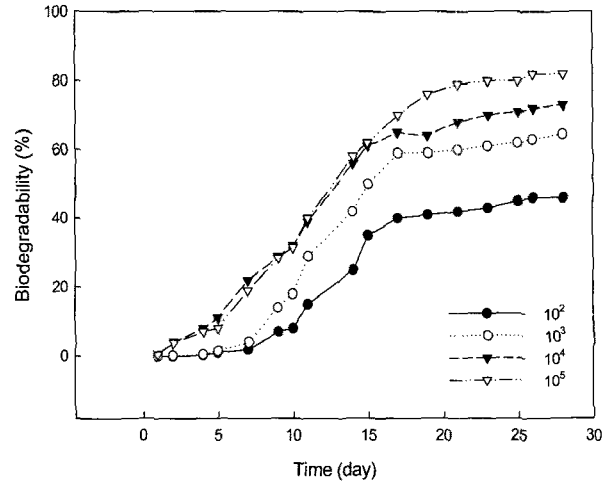


Figure 5. Effect of cell concentration on biodegradability.

생분해도 평가에 있어 미생물의 농도는 아주 중요한 인자이다. 접종원의 미생물 군수가 너무 작게 되면 생분해가 잘 일어나지 않고 군수가 너무 많게 되면 생분해는 잘 일어나지만 접종물에 따른 무기탄소로부터 이산화탄소가 발생이 되기 때문에 바탕시험의 오차 및 시험의 재현성이 떨어지게 된다. 실험 결과 15일이 경과되었을 때  $10^4 \sim 10^5$  CFU/mL은 60%가 넘는 생분해도를 보였지만,  $10^2 \sim 10^3$  CFU/mL은 60%를 넘지 못하였다. 28일이 경과 되었을 때  $10^5$  CFU/mL이 85.8%로 가장 좋은 생분해도를 보였다(Fig. 5). 최종적으로 미생물의 농도를  $10^4 \sim 10^5$  CFU/mL으로 하는 것이 바람직할 것으로 판단되었다.

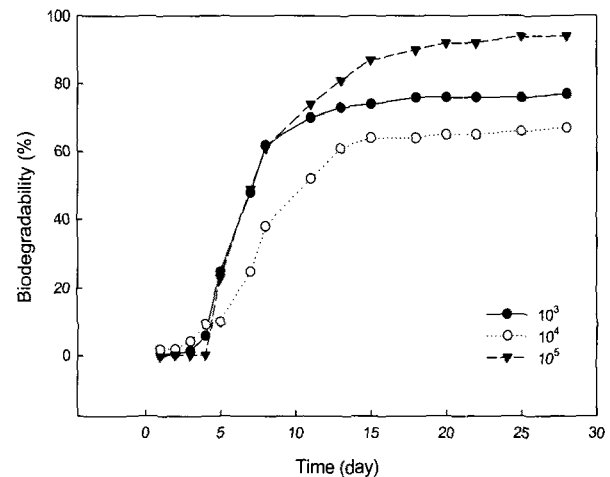


Figure 6. biodegradability of reference compound (Aniline).

접종원의 미생물 농도별 표준물질의 생분해도를 평가하기 위하여 접종원의 미생물 농도를  $10^3 \sim 10^5$  CFU/mL로 변화를 주어 생분해도 시험을 하였다. 사용한 접종원은 접종원의 미생물 농도별 윤활유 시료의 생분해도를 평가하기 위한 방법과 동일하게 사용 하였다. 실험 14일째부터  $10^3$  CFU/mL을 제외한 모든 시험군의 생분해도가 60%를 초과 하였고, 28일째

10<sup>3</sup> CFU/mL, 10<sup>4</sup> CFU/mL 그리고 10<sup>5</sup> CFU/mL의 생분해도가 각각 77%, 67% 그리고 94% 이었다. 이는 정 등(2004)이 보고한 ISO 9439 방법에 따른 접종원 농도 10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> CFU/mL의 표준물질 생분해도가 실험보다 28일째 10% 정도의 높은 생분해도를 보였다(Fig. 6).

**접종원 종류별 생분해도 시험**

미생물분해 시험평가분야에서 사용되는 표준활성슬러지에 대한 규정은 다음과 같다(6). 접종원의 채취지역은 전국을 대상으로 하여 최소 10군데 이상의 장소에서 채취해야 하며, 주로 화학물질이 많이 사용되고 폐기되는 지역의 도시하수처리장 및 산업폐수처리장 반송활성오니, 강, 호수, 바다 등 표층수, 공기와 접촉하는 물가의 표토에서 미생물을 채취한다. 여러 지역에서 채취해 온 활성오니 및 미생물을 같은 용기 내에서 혼합하여 정지한 후 부유물을 제거한다. 상등액의 pH를 수산화나트륨 또는 인산을 이용하여 7.0±1.0으로 조정후, Whatman (No. 2) 여과지를 통하여 여과한다. 여액을 미생물배양기에 옮겨 약 4 L/min의 유량으로 23.5시간동안 공기를 공급한다. 30분간 공기공급을 중단한 후, 전체 부피의 1/3에 해당하는 상등액을 제거하고 같은 양의 0.1% 합성배지를 가해 다시 공기를 공급하며, 25±2℃에서 배양한다. 신·구접종군의 동일한 활성도를 유지하기 위하여 현재 시험에 사용하고 있는 상등액을 여과한 여액과 새로 채취한 접종원 상등액을 여과한 여액을 같은 양씩 혼합하여 배양한다. 접종원의 활성도 점검 표준물질 (aniline)을 사용하여 적어도 3개월마다 1회씩 정기적으로 활성도를 점검한다.

Fig. 7에서 보는 바와 같이 초기의 적응 생분해도 속도는 하수처리장 폭기조의 활성오니, 표준활성슬러지, 하수의 토양으로부터 채취한 슬러지 순이었지만, 9일 경과 후부터는 표준활성슬러지 보다 하수의 토양으로부터 채취한 슬러지의 생분해도가 높아지기 시작하였다. 실험결과와 접종원 조제의 단점으로 인하여 하수의 토양으로부터 채취한 슬러지는 권장할 만하지 않으며 표준활성슬러지 또는 하수처리장 폭기조의 활성오니를 사용하거나 두 가지를 병용하는 것이 바람직한 것으로 판단되었다.

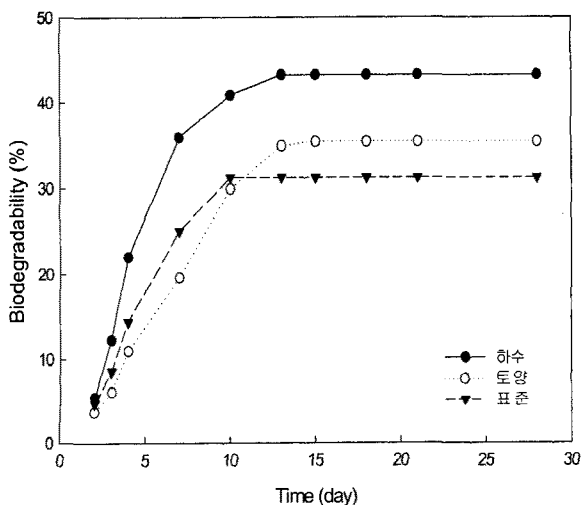


Figure 7. Time courses of biodegradation test for lubricant oil.

**테스트의 타당성 (Test validation)**

이상의 생분해도 시험결과를 실제적인 분석치로 활용하고자 할 때는 시험분석이 적절한 타당성을 갖고 시험되었는지 확인하는 절차가 필요하다. 이러한 타당성의 조사방법은 OECD 301B, ISO 9439, ASTM D 5864에 의하면 다음과 같다. 첫째, 분석시료의 상대오차가 20%를 넘지 않아야 한다. 둘째, 표준물질이 28일에 40%의 생분해도를 나타내야 한다. 셋째, 독성대조군에서 생분해도가 28일에 40% 이상이어야 한다. Table 3에서 보는 바와 같이 시료들을 동일한 조성과 농도로 준비하여 분석하였을 때 시험 용기간의 최종 생분해도 오차는 7.3%이었고, 28일째 분석절차대조군의 생분해도는 45~99% 이었다. 독성대조군은 생분해가 용이한 aniline과 분석 물질을 함께 넣어줌으로써 aniline의 생분해에 대한 분석물질의 독성을 테스트하는 과정이다. 배치별, 제품별, 농도별과 접종원별의 분석에 있어서 독성 대조군의 분해율은 각각 86.6%와 94%이었으며, 이 또한 셋째 조건을 만족 시키는 결과이었다. 이상으로 생분해도 분석절차상의 오류가 없었음을 확인하였다. 그러나 접종원별비교에서 표준물질의 생분해도가 45%로서 만족시키지 못할 뿐만 아니라 규격에 제시되어 있는 둘째 validation 기준을 만족시키지 못하였다.

Table 3. Validation criteria and validation result

| Validation criteria                                   | medium | product | concentration | inoculum |
|---|--------|---------|---------------|----------|
| Relative error (%) < 20%                              | 7.6    | 7.1     | 7.3           | 7.2      |
| Biodegradability of procedure control at 28 day > 60% | 99     | 91      | 81            | 45       |
| Biodegradability of toxicity control at 28 day > 40%  | NA*    | 86.6    | 94            | NA*      |

\* NA : not available.

**요 약**

윤활유의 생분해도 평가를 위해 개발된 국제규격을 검토하고 국내에서 적용 가능한 방법을 개발하였다. OECD 301B, ISO 9439, ASTM 5864 등의 국외규격 중 윤활유의 생분해도 평가에 적용 가능한 규격은 주로 호기적 조건 및 액상배지 (aqueous medium) 상에서 생분해도를 평가하도록 규정하고 있고, 이들 규격은 공통적으로 이산화탄소 발생법 (CO<sub>2</sub> evolution test)에 근간을 두고 있다. 하수처리장 등에서 얻어진 미생물 접종원을 시험화합물과 함께 무기물이 함유된 액상배지에서 배양시키면서 시험화합물의 유기탄소가 미생물의 효소 작용에 의해 분해되고 산화되어 최종적으로 이산화탄소로 무기물화 (mineralization) 되는 바탕을 근거 하에 생분해성 윤활제품의 생분해도를 조사하였다. 배치별로 생분해도를 비교하였을 경우 ASTM 5864에서 규정된 배치성분을 이용할 경우 생분해도가 높았고, 접종원 농도를 10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup> CFU/mL로 하였을 때 생분해도가 높았다. 또한 접종원의 종류가 생분해도 평가에 미치는 영향을 검토하였다. 본 연구에서 제안된 생분해도 시험에 대한 밸리데이션 결과 국제규격에 제시된 밸리데이션 기준을 만족하는 것으로 확인되었다. 이러한 시험

결과를 토대로 국내에서 적용 가능한 윤활제품의 생분해도 시험을 위한 표준작업절차를 마련하였다.

### 감 사

본 연구는 산업자원부 표준화기술개발사업 (10023294) 지원으로 수행된 것으로, 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

1. Park, K., H. Jung, and H. J. Chae (2004), Microbiological stability test of biodiesel, *Kor. J. Acad. Ind. Soc.*, **4**, 387-390.
2. OECD (1993), OECD 301B: Guidelines for the testing of chemicals: 301B CO<sub>2</sub> evolution, Organisation for Economic Cooperation and Development.
3. ISO (1990), ISO 9439: Water quality-evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds aqueous medium-carbon dioxide evolution test, International Organization for Standardization (ISO).
4. ASTM (1995), ASTM D 5864: Test method for determining the aerobic aquatic bio degradation of lubricants or their components, American Society for Testing and Materials (ASTM).
5. Larson, R. J. (1979), Estimation of the biodegradation potential of xenobiotic organic chemical, *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 1153-1161.
6. H. Jung, E. Y. Kim, and H. J. Chae (2004), Biodegradability tests of biodiesel-derived pentaerythritol lubricant oil bases, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 132-137.
7. NREL (1998), Life cycle inventory of biodiesel and petroleum diesel for use in an urban bus, NREL/SR-580-24089, National Renewable Energy Laboratory.
8. Kim, Y. H., H. K. Chung, E. K. Kim, and T. I. Yoon (1993), Studies on the biodegradation test method of surfactant, *Kor. J. Biotechnol.* **8**, 364-369.
9. Kang, Y. K., C. H. Park, and S. S. In (2002), Biodegradabilities of cellulose fibers, *Kor. J. Fiber Soc.* **39**, 274-281.