

공초점반사현미경법을 이용한 섬유의 외부소섬유화 분석

권오경[†]

접수일(2014년4월11일), 수정일(2014년4월21일), 채택일(2014년4월23일)

Analysis of External Fibrillation of Fiber by Confocal Reflection Microscopy

Ohkyung Kwon[†]

Received April 11, 2014; Received in revised form April 21, 2014; Accepted April 23, 2014

ABSTRACT

Confocal Reflection Microscopy (CRM) was applied to investigate external fibrillation of different types of fibers such as Kajaani reference fiber, Whatman filter fiber, thermomechanical pulp (TMP), and recycled TMP fiber. It was confirmed that the CRM images are created from surface structures of the fiber cell wall. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) captured overall shape of the fiber, but minute details of the surface of the fiber were missed. CRM captured the minute details of the fiber surface. From the CRM and CLSM images, it was observed that the CRM images mainly appeared on the fiber surfaces. External fibrillation of the fiber occurs at the fiber surface, not inside the cell wall. Thus, it was concluded that investigation on the external fibrillation of the fiber was possible by utilizing CRM images. A direct qualitative and quantitative method for analysis of external fibrillation of fiber was demonstrated by utilizing surface area to volume ratio, volume fraction, and roughness calculated from 3-dimensional images reconstructed from stacks of CRM images from the different fibers.

Keywords : Confocal reflection microscopy, CRM, CLSM, external fibrillation

1. 서론

섬유의 형태와 물리적인 변화는 섬유의 강도, 유연성, 직경, 비표면적, 섬유간 결합에 영향을 미치며 생산

되는 종이의 재질에 큰 영향을 주게된다.¹⁻¹¹⁾ 따라서, 펄프 섬유의 형태와 물성을 파악하는 것은 매우 중요한 일이다. 섬유 및 종이의 성질에 영향을 주는 고해의 효과는 외부소섬유화(external fibrillation), 내부소섬유

• 서울대학교 농생명과학공동기기원 나노바이오이미징센터 (Seoul National University, National Instrumentation Center for Environmental Management, Nanobioimaging Center)

† 교신저자(Corresponding author) : E-mail : zoom@snu.ac.kr

화(internal fibrillation), 미세섬유화(fines), 단섬유화의 내 가지로 나눌 수 있으며, 이러한 효과가 섬유나 종이의 성질에 미치는 영향을 분석하는 방법은 섬유나 종이에 가해진 외부적인 요인(고해, 압착, 캐린더링 등)에 의한 물성 변화를 물리적 및 광학적인 성질의 변화를 측정하여 추정하는 간접적인 방법과, 다른 처리 방법에 따른 섬유나 종이의 형태 변화를 직접적으로 관찰함으로써 그 효과를 해석하는 직접적인 방법으로 나뉜다.

직접적인 방법은 외부소섬유화, 내부소섬유화, 미세섬유, 단섬유를 직접 관찰, 측정하는 방법이므로 미세 형상을 직접적으로 관찰할 수 있는 현미경을 이용하여야 한다. 현미경은 다양한 화학적, 물리적 처리조건에 따른 섬유의 형태 변화, 제조 조건에 따른 종이의 구조 변화 관찰 등의 연구에 다양하게 적용되어왔다. 고해의 효과를 평가하는 직접적인 방법으로써 광학현미경법(투과광학현미경법, 편광현미경법), 주사전자현미경법, 공초점현미경법을 이용하여 고해 조건에 따라 섬유가 어떠한 형태적인 변화를 일으켰는지를 직접 관찰, 분석할 수 있다.¹²⁻²¹⁾

광학현미경법(Light Microscopy)은 가장 쉽게 이용할 수 있는 방법으로 펄프 섬유를 젖은 상태로 관찰할 수 있다는 장점이 있지만, 분해능의 한계(약 200 nm)로 인해 섬유의 미세한 소섬유를 관찰하는 데에는 한계가 있다. 또한, 검출된 형태적 변화의 경우에도 그 변화가 섬유의 내부 또는 외부에 발생한 것인지 구분할 수 없다는 단점이 있다.

주사전자현미경법(Scanning Electron Microscopy; SEM)의 경우에는 분해능이 우수하여 나노미터 수준의 미세한 변형을 판별할 수 있다. 하지만 일반적으로 시료를 건조시키는 과정이 필요하므로 젖어 있는 섬유의 형태적인 특성을 관찰하는데에는 사용할 수 없다는 단점이 있다. 기존의 주사전자현미경법의 단점을 보완하기 위해 ESEM(Environmental Scanning Electron Microscope)과 Cryo-SEM을 사용하여 젖은 시편을 그대로 관찰하거나, 건조 과정 대신 시편을 동결하여 젖어 있을 때의 섬유 상태를 보존하여 관찰하는 방법을 사용할 수 있다. 하지만 주사전자현미경은 바깥으로 드러난 부분의 표면만을 관찰할 수 있으므로, 섬유의 내부를 관찰하기에는 적합하지 않은 방법이다.

공초점현미경법(Confocal Laser Scanning Microscopy;

CLSM)의 경우 광학현미경법과 주사전자현미경법에 비해 섬유의 내부, 외부 형태 변화를 모두 관찰할 수 있다는 큰 장점이 있다. 비파괴적인 방법으로 섬유의 내부를 관찰할 수 있으며, 물에 담겨 있는 시편을 그대로 관찰할 수 있으므로 섬유 건조에 의한 비가역적인 변형의 영향을 최소화할 수 있다. 대부분의 펄프, 제지 공정에 물이 사용되므로 건조를 하지 않고 섬유의 형태를 관찰할 수 있다는 것은 매우 유용한 특징이다. 이 특징을 이용하면 기계적인 처리를 받은 섬유의 물속에서의 형태적, 물리적특징이 어떻게 종이의 물성에 영향을 미치는가를 분석할 수 있다.

CLSM의 가장 큰 특징은 3차원 화상을 획득할 수 있다는 것이다. 이것은 CLSM이 광학절편(optical section)을 형성할 수 있기 때문이며, 광학절편을 이용하면 섬유의 내부를 비파괴적으로 관찰할 수 있다. 광학절편의 두께는 검출에 사용되는 파장에 따라 달라지지만, 최소 약 0.5 μ m까지 가능하다. 초점위치에서 광학절편의 두께에 포함된 시료에서만 신호를 검출하여 화상을 형성하며, 초점을 순차적으로 바꾸어가면서 화상을 획득하면 두께 방향으로 연속적인 단면 화상들을 만들어 낼 수 있다. 이 단면 화상들을 3차원으로 재구성하여 시편의 3차원적인 형태를 입체적으로 관찰할 수 있다.

섬유의 내부 및 외부소섬유화는 종이의 재질에 큰 영향을 주는 인자이지만 그 역할에 대해서는 논쟁의 여지가 남아 있다.¹⁻³⁾ 외부소섬유화의 효과로 인해 종이의 밀도가 증가하지만 종이의 인장강도에는 영향을 미치지 않는다.¹⁾는 주장과 외부소섬유화의 증가는 인장강도의 증가를 가져온다는 주장^{2,3)}이 있다. 외부소섬유화의 증가에 따라 내부결합강도와 인장강도가 증가하는 이유는 별도로 미세섬유(fines)를 추가할 때 인장강도가 증가하는 이유와 동일하다는 주장이다. 이러한 주장에 대한 실험적인 근거를 찾아내기 위해서는 섬유의 외부소섬유화를 정밀하게 정량화할 수 있는 방법이 필요하다.

SEM을 사용하면 섬유의 외부소섬유화의 정도를 가장 정확하게 관찰할 수 있다. 하지만, 젖은 섬유를 건조시키는 과정이 필요하므로 섬유에 존재하던 미세한 소섬유가 SEM 전처리 후에는 관찰되지 않을 수도 있다. 뿐만 아니라 SEM 화상은 입체적인 느낌을 주기는 하지만 실제로는 섬유의 최외각 표면의 형태만 검출된 것을 보는 것이다. 외부소섬유화의 효과는 표면 뿐만

이 아니라 섬유 세포벽에 더 가까운 부분과 섬유의 내부를 모두 고려하여야 정확한 분석이 가능하다.

외부소섬유화의 정도를 CLSM을 이용하여 측정할 수 있지만, 형광 신호의 특성상 표면의 구조가 아닌 초점위치의 여기부피(excitation volume) 안에 있는 모든 형광 염료에서 발생하는 신호를 검출하게 된다. 그 결과로 CLSM으로 획득한 화상에서는 세밀한 표면의 형태가 확실하게 드러나지 않는 경향이 있다. 뿐만 아니라 형광 물질이나 염료가 없는 부분에서는 신호를 검출할 수 없으므로 시편의 정확한 형태가 나오지 않을 수도 있다. 외부소섬유화의 경우 섬유 세포벽의 일부가 분리된 상태로 섬유에 붙어있는 상태를 말하며, CLSM을 사용할 경우 비교적 큰 변형을 보이는 소섬유는 쉽게 관찰이 되지만 미세한 소섬유와 세포벽의 변형을 검출하기는 어렵다. 외부소섬유화를 정량화 할 때 미세한 소섬유와 세포벽의 미세 변형을 검출하는 것은 소섬유화의 효과를 평가하는데 중요한 요소이다. 따라서 CLSM 보다 표면 형태 변화에 감도가 뛰어난 방법을 모색할 필요가 있다.

공초점반사현미경법(Confocal Reflection Microscopy; CRM)²²⁻²⁴⁾은 형광이 아닌 반사를 이용하여 재료의 3차원 이미지를 획득할 수 있는 방법이다. 형광성질이 있는 화학적인 성분이 필요한 일반적인 CLSM과는 달리 CRM은 시료내의 구성성분의 반사를 이용하는 방법이다. 시료에 형광염료 처리를 할 필요가 없으므로 형광 처리를 적용하기 어렵거나 하지 말아야 하는 경우에도 사용할 수 있다. CRM은 섬유의 미세한 소섬유처럼 작은구조나 균열 부분의 화상대비가 강하게 나타나는 장점을 가지고 있다. 높은 대비로 인해 구조의 크기가 광학현미경의 해상도 한계에 가까워서 CLSM으로는 검출되지 않던 균열부위가 명확하게 드러나게 되는 경우가 많다.

CRM은 광학절편 안의 MF(Microfibril)를 따라 생성된 세포벽의 미세 균열 또는 공간에서 반사되어 나오는 빛을 획득하여, 직접적으로 MF의 배열을 관찰하는데 사용되었다.²⁵⁻²⁷⁾ CRM으로 획득된 이미지와 편광 필터를 이용하여 목재 섬유의 S2층 MFA(Microfibril angle)를 측정할 수 있었으며,²⁵⁾ 목재 세포벽의 MF를 따라 형성된 요오드 결정을 제거한 후 형성된 미세공극을 이용하여 MF의 이미지를 획득하고 관찰하였다.²⁶⁾ 또한 세포벽에 발생한 미세한 할렬을 이용하여 MF의

배향을 관찰하는데 이용되었다.²⁷⁾ 상기한 연구에서는 CRM을 화학적, 물리적인 방법을 이용하여 생성된 섬유 세포벽의 물리적인 변형으로부터 MF를 직접적으로 관찰하고 측정하는데 이용하였지만, 외부소섬유화의 정도를 평가하는데 이용되지는 않았다.

외부소섬유화는 섬유를 목재로부터 떼어내는 과정에서 가해진 외력(화학적, 물리적인 처리)에 의해 물리적인 변형을 일으킨 섬유의 표면 상태를 말하므로 CRM을 이용하여 직접적으로 소섬유화된 섬유 표면의 이미지를 획득할 수 있다. 외력에 의한 섬유의 변형은 2차벽의 S1, S2, S3층 사이의 벌어짐, 찌그러짐, 균열, 거칠어짐과 같은 형태로 나타날 수 있으며, 결과적으로 섬유 세포벽의 반사 특성을 변화시키게 된다. 이러한 외력 조건의 변화에 따른 반사 특성의 변화를 CRM을 이용하여 3차원 이미지화하고 정량화한다면 외부소섬유화를 평가하는 기술로서 유용하게 이용할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 상기한 CRM과 CLSM의 특징을 이용하여 섬유세포벽의 형태변화와 외부소섬유화의 평가방법으로 사용할 수 있는지를 분석하였으며, 다양한 조건에서 생산된 섬유에서 CRM, CLSM 화상을 획득하여 섬유의 외부소섬유화로 인한 형태적인 차이를 관찰하고 정량적으로 비교 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시재료

공시재료로 Fiber Lab(Metso사)에서 사용되는 Kajaani 표준섬유(Reference Fiber Set), 여과지(Whatman filter paper)의 섬유, 섬유판 제조용으로 생산된 열기계 섬유(thermomechanical pulp, TMP), 섬유판에서 재생한 재활용 섬유(recycled TMP fiber)를 사용하였다. 이 섬유들은 사용 목적이 매우 상이하며, 사용 목적에 따라 섬유의 생산 조건에 차이가 크다. 따라서, 섬유간의 외부소섬유화 특성이 다를 것으로 예상되었으며, CRM으로 외부소섬유화를 이미지화하여 섬유의 외부소섬유화를 정량적으로 평가하는데 적합한 시료들로 판단되었다.

검경을 위해 섬유를 물에 분산시킨 후에 슬라이드 (slide glass) 상에 올려놓고 커버슬립(No. 1)을 덮은 후

과량의 물을 제거하였다. 수분의 증발을 막기 위해 커버슬립과 슬라이드 사이를 여성용 손톱 광택제로 커버슬립의 가장자리를 발라 밀봉하면서 슬라이드에 고정시켰다.

2.2 공초점현미경

본 연구에서 사용된 공초점현미경시스템은 Leica TCS SP8 STED(Leica Microsystems, Germany)이며 검경에는 40X/1.1 water immersion 대물렌즈를 사용하였다. 40X water immersion lens를 사용한 이유는 충분한 working distance(WD; 렌즈의 끝 부분에서 초점면까지의 거리)의 확보와 구면수차(spherical aberration)를 최소화하기 위해서이다. 40X 렌즈의 WD가 63X, 100X 렌즈에 비해 길기 때문에 커버슬립에서 멀리 떨어진 섬유를 관찰할 때 유리하다. 또한 63X, 100X 렌즈는 커버슬립 위에 오일을 떨구어 사용하는데, 시료를 담고 있는 매질인 물과 오일과의 굴절률 차이로 인한 구면수차가 발생한다. 이 구면수차로 인해 획득하게 되는 화상의 분해능이 저하되는 결과를 가져오게 된다. Water immersion 렌즈를 사용하면 시료를 담고 있는 매질과 대물렌즈쪽 매질의 굴절률 차이를 최소화하여 대물렌즈에서 얻을 수 있는 최고의 분해능을 사용할 수 있다.

광원으로는 아르곤(Argon)가스레이저의 488 nm 라인을 사용하였다. 488 nm 레이저는 섬유 세포벽의 리그닌의 자연형광을 유발하는 것으로 알려져 있으므로^{28,29} 형광 염료의 처리 없이 세포벽의 화상을 획득하는데 사용할 수 있다. 리그닌의 농도가 높을수록 강한 신호가 발생하는 것으로 알려져 있다.

2.3 공초점반사현미경법

CRM은 일반적인 CLSM 설정과는 달리 dichroic (또는 beam splitter)과 방출광필터(emission filter)가 여기광선(excitation light)을 통과할 수 있도록 설정함으로써 사용할 수 있다.

Leica TCS SP8 STED에는 AOBs(Acousto-Optical Beam Splitter)라는 소자가 여기광선과 방출광선(emission light)을 분리해주는 역할을 하며, 이 소자의 모드를 반사(reflection)모드로 설정하고, 검출기의 검출과장을 여기광선의 파장과 동일하게 만들면 CRM을 사용할 수 있다. 검출기앞에 있는 바늘구멍(pinhole)의 크기는

488 nm 파장을 기준으로 1 Airy unit으로 설정하였으며, 이 설정으로 획득되는 광학절편의 두께는 1.07 μm 였다.

동일한위치(초점위치, XY 위치)에서 CRM(반사된 여기광을 검출)과 CLSM(여기광을 흡수한 후 방출되는 형광신호를 검출)으로 이미지를 획득하여 상호보완적으로 사용하였다. CLSM으로 검출되는 신호의 세기는 여기부피(excitation volume) 내의 형광물질의 농도와 효율에 비례하며, 동일한 여기부피내의 형광물질의 위치와 배향에 의한 영향이 미미하다. 반면 CRM에서 검출하는 신호는 반사된 여기광이므로 여기부피내의 물질의 조성(굴절률차이) 및 배열에 민감하게 반응한다. 따라서 두 가지 방법으로 획득된 이미지는 서로 다른 정보를 포함하고 있으며 상호보완적으로 사용될 수 있다.

3차원 이미지의 획득을 위하여 Z축방향(현미경의 광축에 평행, 섬유 관찰 시에는 섬유의 세포벽 두께 방향)으로 초점위치를 바꾸어가며 이미지를 획득하였는데, 초점위치의 간격은 광학적 절편두께의 1/2이하로 설정하였다. Z축 초점범위는 섬유의 단면이 모두 포함될 수 있도록 약 40 ~ 60 μm 정도로 설정하였다.

2.4 표면특성의 정량화

외부소섬유화를 객관적으로 평가하기 위해 화상분석 기법을 적용하여 표면의 특성을 정량화 할 수 있다.³¹⁻³³ CRM으로 획득한 3차원 이미지로부터 다양한 조건에서 생산된 섬유의 외부소섬유화를 정량적으로 판단하기 위해 ImageJ³⁰와 플러그인을 이용하였다.

비표면적(Surface Area to Volume Ratio)을 계산하기 위해 BoneJ³¹라는 ImageJ의 플러그인을 이용하였다. BoneJ 플러그인은 뼈의 3차원적 형태를 분석하기 위해 개발되었으나, 다양한 재료의 형태적 특성을 정량화하는데 이용할 수 있다. 여러 기능 중에서 Isosurface와 Volume Fraction(VF) 기능으로 섬유의 표면적, 섬유의 부피, 섬유가 포함된 육면체의 부피를 계산할 수 있으며, 이 값들을 이용하여 섬유의 비표면적(SA:V)과 부피비율(VF)을 계산할 수 있다.

비표면적 값이 큰 물질은 직경이 매우 작거나 다공성이 높게 나타나므로 섬유의 외부소섬유화의 정도를 비표면적 값으로 평가할 수 있다. 부피비율은 측정 대상의 전체 부피에서 섬유가 차지하는 부피를 나타내며

로 측정 부피내의 조밀한 구조를 가진 섬유의 크기가 클수록 크게 나타난다.

CRM으로 획득한 3차원 이미지에서 표면적과 부피를 계산하기 위해서는 3차원 재구성 과정을 거쳐야 한다. 이때 이미지에 thresholding을 적용하여야 하는데, CRM 화상획득 시 PMT(Photomultiplier Tube)의 배경값과 신호증폭값의 차이로 인해 수동으로 thresholding 값을 정하는 것은 계산 결과를 부정확하게 만들 수 있다. 또한 thresholding 과정에서 섬유의 미세한 구조가 제외될 가능성이 있으므로 여러가지 자동화 thresholding 방법을 시험하여 주관적인 요소를 배제함과 동시에 미세한 소섬유의 이미지가 가능한 많이 포함될 수 있도록 하였다. 다양한 자동화 방법 중에 Li 방법³⁴⁾이 가장 적합한 것으로 판단되어 본 연구에서 사용한 모든 이미지에 대해 Li 방법을 적용하였다.

Thresholding을 거쳐 생성된 흑백이미지에 대해 BoneJ의 isosurface를 적용하여 섬유가 차지하는 voxel(volume picture element)을 포함하는 표면을 구성하여 표면적을 계산하게 된다. 표면을 재구성할 때 resampling값을 선택하여야 하는데, 값이 작을수록 세밀한 표면의 형태를 보존할 수 있다. 본 연구에서는 가능한 세밀한 표면구조를 포함할 수 있도록 resampling 값을 2로 정하였다.

거칠기를 계산하기 위해서 Extended Depth of Focus (EDF)³²⁾와 SurfCharJ³³⁾플러그인을 이용하여 CRM으로 획득한 3차원 이미지에서 거칠기(Rq)와 섬유의 거칠기 두께(Rt)를 계산하였다. 섬유의 거칠기 정도를 나타내는 Rq값은 Root Mean Square 방법으로 계산되며, 기준면에서 측정 부위까지의 거리 차이가 크게 다양하게 나타날수록 큰 값을 얻게된다. Rt는 높이 값의 최저점, 최고점 사이의 거리이며 섬유의 가장 두꺼운 부분의 두께를 의미한다. 따라서, 섬유가 납작한 형태이면 Rt가 작아진다.

3. 결과 및 고찰

3.1 공초점반사현미경법 이미지의 특징

CRM은 반사광을 이용하는 현미경 기술이므로, 반사면의 방향과 반사효율에 따라 검출되는 신호의 세기가 달라진다. CLSM과 CRM은 대물렌즈로 레이저를

수백 나노미터 수준의 작은 probe(여기광선의 Point Spread Function)로 만들어 시료의 표면을 주사한다. 광자로 이루어진 probe가 시료의 표면을 주사하는 동안 광자가 시료와 상호작용을 한 후의 발생하는 신호를 PMT로 검출하게 된다. 이때 검출되는 신호의 종류에 따라 CLSM은 형광 신호를, CRM은 반사된 신호를 검출한다는 차이가 있다.

CLSM의 화상은 시료의 형광 물질의 분포에 영향을 받기때문에 시료 자체의 형상을 정확하게 표현하지 못하는 경우가 많다. CLSM을 사용할 때 시료의 전체적인 형태를 알아보기 위해 투과광학현미경(Transmission Light Microscope)이나 미분간섭대비법(Differential Interference Contrast)을 이용하여 사진을 찍어 함께 사용하는 이유도 형광 물질의 분포가 시료의 실제 형태와 차이가 있기 때문이다.

반면 CRM의 화상은 반사가 발생하기만 하면 신호를 검출할 수 있으므로, CLSM에 비해서 시료의 실제 형태에 더 가까운 화상을 생성할 수 있는 방법이다. 이러한 특징을 TMP 섬유 표면을 찍은 화상에서 확인할 수 있다(Fig. 1). Maximum Intensity Projection(MIP) 이미지(Fig. 1)는 연속된 초점위치에서 획득된 광학절편 화상들로부터 형광현미경으로 관찰하는 것과 비슷한 화상을 생성하는 화상처리 방법이다. MIP 화상에서는 섬유의 내부, 외부의 모든 구조가 초점위치와는 상관없이 한 화상에 나타나게된다.

두 사진을 비교해 보면 CRM에 의한 섬유의 화상

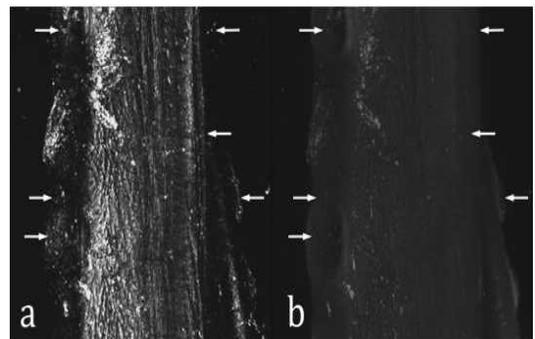


Fig. 1. Maximum Intensity Projection (MIP) of CRM (a) and CLSM (b) micrographs. The CRM image showed more fine structures than the CLSM image (arrows). Some of the fine structures were not observable in the CLSM micrograph.

(Fig. 1a)은 CLSM으로 획득한 화상(Fig. 1b)에 비해 섬유 배향과 표면의 형상이 매우 잘 드러나있음을 알 수 있었다. 또한 CRM의 화상에서는 CLSM에서 잘 드러나지 않던 세밀한 구조가 명확하게 드러나 있었다 (Fig. 1a의 화살표). 이러한 구조들은 반사에 의해 검출된 것이므로 섬유에 실제로 존재하는 구조들이다. 따라서, 형광신호를 검출하는 방법으로는 명확하게 드러나지 않던 구조들을 반사신호로 검출할 수 있음을 확인할 수 있었다. 이렇게 CRM 사진에서 검출 가능한 미세한 구조는 CLSM으로 섬유의 외부피브릴화의 효과를 분석할 때 쉽게 누락될 수 있는 정보로 생각된다.

CRM으로 검출된 신호가 어디에서 발생하는지를 확인하기 위해 재구성된 섬유의 3차원 화상에서 섬유의 여러 단면을 관찰하였다(Fig. 2). 붉은색은 CLSM으로 획득한 신호이며 초록색은 CRM으로 획득한 신호이다. Fig. 2a와 2b는 섬유의 횡단면을 보여주고 있다. 화살표는 섬유세포벽에서 외부표면(중간층 쪽)과 내부표면(내강 쪽)을 가르키고 있으며, 종단면 화상(Fig. 2c와 2d)에서는 횡단면에서 표시된 부분에 대한 종단면의 구조를 보여주고 있다.

그림에서 볼 수 있는 것처럼 CRM의 신호는 섬유의 내부표면과 외부표면에 집중되어 있으며, 두 경우 모두 표면의 구조가 매우 잘 나타나 있다. 외부표면에서는 세포벽의 외부를 감싸고 있는 구조(Fig. 2c)가 관찰되었으며, 내부표면은 긴 형태의 구조가 섬유축에 일정각도를 가지며 배열(Fig. 2d)되어 있음을 알 수 있었

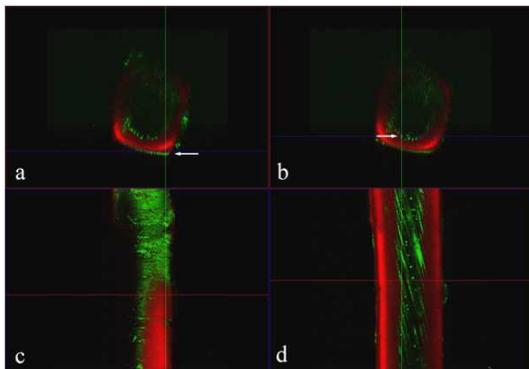


Fig. 2. View of cross and longitudinal sections of fiber. Outer (a and c) and inner (b and d) surfaces of the fiber were rough in the CRM micrograph, but smooth in the CLSM micrograph.

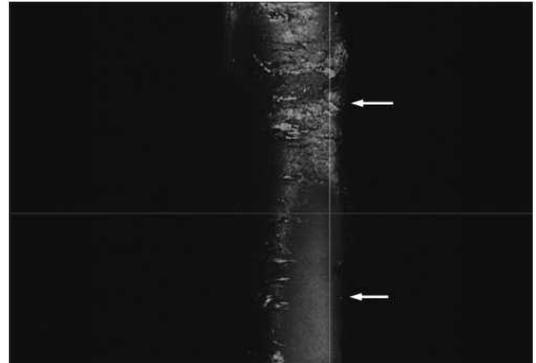


Fig. 3. Grayscale picture of Figure 2c. The upper part of the fiber showed very rough surface (top arrow), but the lower part of the fiber showed very smooth surface compared to the upper part (bottom arrow).

다. Fig. 2c에는 섬유의 외부표면의 실제형상이 나타난 것으로 보이며, Fig. 2d에는 셀룰로즈 마이크로피브릴이 드러난 것으로 판단되었다. Fig. 2에서는 CRM과 CLSM 신호의 차이를 보이기 위해 다른 색깔을 부여하였지만, 두 화상 모두 한 섬유 상의 구조임을 고려하여 색깔을 없애고 신호의 강도로만 구성된 화상(Fig. 3)을 생성하였다. 이렇게 만들어진 화상은 실제 섬유 표면의 형상에 좀 더 가까운 것으로 판단되었다. Fig. 3을 살펴보면 섬유의 표면이 매우 거친 부분(위쪽 화살표)과 평활한 부분(아래쪽 화살표)를 관찰할 수 있었는데, 거친 부분은 CRM에 의해 검출된 표면형상이 나타나 있는 상태이며 평활한 부분은 CLSM에 의해 만들어진 화상이다. 이와 같이 CLSM을 이용하여 외부피브릴화를 평가하는 경우 실제 섬유의 표면 형상에 의한 효과를 제대로 평가할 수 없을 수 있다. 따라서 CRM은 섬유의 외부피브릴화로 인한 표면 형상의 변화를 검출하는데 있어서 유용하게 사용될 수 있다.

외부피브릴화처럼 섬유의 표면 형태의 변화가 예상되는 경우에는 CRM의 특징이 유용하게 적용될 수 있다. 뿐만 아니라, CRM은 형광 염료의 처리가 필요없으므로 생산된 섬유를 물 속에서 바로 관찰할 수 있다. SEM을 이용한 외부피브릴화의 분석 방법에 비해 섬유를 공정에서 사용하는 원상태에 가깝게 유지한 상태에서 분석이 가능하다는 장점을 가지고 있다.

CRM의 단점으로 광축에 평행한 세포벽에서는 반사신호가 거의 나오지 않는다는 점을 들 수 있다. 따라

서 CLSM과는 달리 섬유 세포벽 표면 전체의 화상을 획득할 수는 없었다. 이러한 측면은 CRM으로 획득한 화상을 이용하여 외부소섬유화를 정량적으로 평가하고자 할 때에는 반드시 고려해야 할 부분이다.

TMP 섬유의 이미지(Fig. 2)에서 관찰할 수 있는 것처럼, 광축에 평행하게 서있는 세포벽에서는 반사 신호가 잘 검출되지 않으므로 CRM 이미지에서 3차원 이미지를 재구성할 때 실제 존재하는 세포벽의 일부가 없는 것으로 나타난다. 따라서 이러한 현상을 보완하기 위해 CRM과 CLSM으로 획득한 이미지를 결합하여 하나의 이미지로 만들어(Fig. 3) TMP 섬유의 비표면적, 부피비율을 계산하였다.

Kajaani 섬유와 Whatman 섬유의 경우에는 상당한 양의 리그린이 제거된 결과로 섬유의 세포벽의 변형이 매우 심하며 납작한 형태를 보였다. 결과적으로 섬유 표면에서 반사되는 신호의 양에는 문제가 없었으나, CLSM으로 획득할 수 있는 자연형광이 불연속적으로 나타났다. 섬유가 납작한 형태였기 때문에 TMP 섬유에서처럼 세포벽의 일부가 보이지 않는 현상은 없는 것으로 판단되었다. 따라서, Kajaani 섬유와 Whatman 섬유의 비표면적과 부피비율을 계산할 때는 CRM 이미지를만 사용하였다.

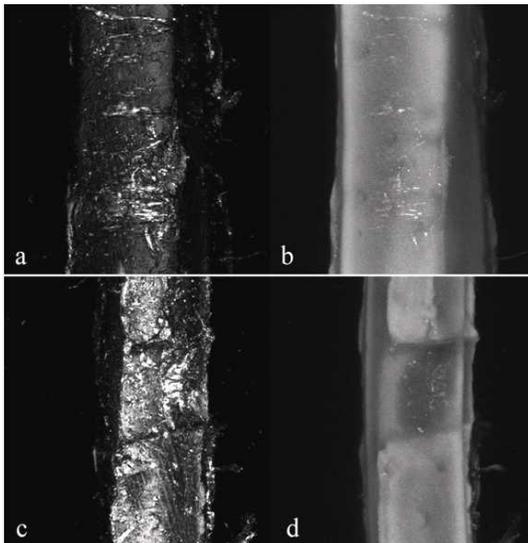


Fig. 4. Morphology of TMP fiber by CRM (a, c) and CLSM (b, d). The CRM micrographs showed more surface details than the CLSM micrographs.

3.2 섬유종류에 따른 외부소섬유화의 차이

Fig.4a와 4c는 CRM으로 획득한 사진들의 MIP 화상이다. CRM 화상과 CLSM으로 획득한 화상인 Fig. 4b와 4d와의 차이가 분명하게 나타나고 있었다. CLSM 화상은 섬유 세포벽의 전체적인 형태를 확인하는데 유용하지만 표면의 미세한 형태를 잘 보여주지 못하였다. 반면 CRM 화상은 세포벽의 전체적인 형태를 보여주지는 못하지만 섬유의 내강 쪽과 외벽의 표면 형상을 잘 보여주고 있다. 또한 CRM의 화상이 주로 섬유 벽의 바깥쪽이 있는 표면 구조를 보여준다는 특징을 고려하면, 섬유의 외부피브릴화를 관찰, 분석하는데에는 CRM으로 획득한 화상을 이용하는 것이 적합함을 알 수 있었다.

TMP 섬유와 재활용 TMP 섬유의 외부형태를 CRM으로 찍은 사진을 이용하여 비교하였다(Fig.5). 이 사진들은 섬유의 직경 방향으로 초점위치를 변경해 가면서 획득한 초점 위치별 화상(optical section 화상)들로부터 MIP 화상을 생성한 결과물들이다. MIP 화상은 각 화상에서 최대의 강도를 보이는 부분을 보여주기 때문에 섬유 내부(내강 쪽)표면과 외부(중간층 쪽)표면에서 반사된 신호가 한꺼번에 관찰된다. 이런 MIP 화상의 특징은 외부피브릴화를 분석하는데 유용하게 사용될 수 있다.

목재에서 생산된 섬유의 경우 섬유의 내강쪽 표면 형태보다 바깥쪽(S1층, 중간층 위치)의 표면 형태가 명확하게 나타났다(Fig.5a, 5c, and 5e). 섬유의 내강 쪽 표면은 비교적 평활한 편이었으며, 마이크로피브릴 방향으로 균열이 발생한 것을 관찰할 수 있었다. 이는 섬유의 생산 공정에 의한 효과가 주로 중간층에 가해졌으며, 섬유가 기계적으로 분리될 때 세포벽 내부에 균열이 생성되었음을 유추할 수 있다. 중간층이 분리될 때 중간층의 일부가 섬유 표면에 남아있게 되며, 세포벽의 일부가 뜯겨 나오면서 외부피브릴이 형성되었음을 보여주고 있다.

이에 비해 재활용 섬유는 섬유의 바깥쪽 표면의 변형과 더불어 내강 쪽 표면의 변형이 심하게 발생하였음을 관찰할 수 있었다(Fig.5b, 5d, and 5f). 재활용 TMP 섬유에서는 TMP 섬유에 비해 외부표면의 형태가 잘 드러나지 않았다. 이것은 외부표면의 외부피브릴화에 비해 내부표면의 외부피브릴화가 더 많이 발생하였고,

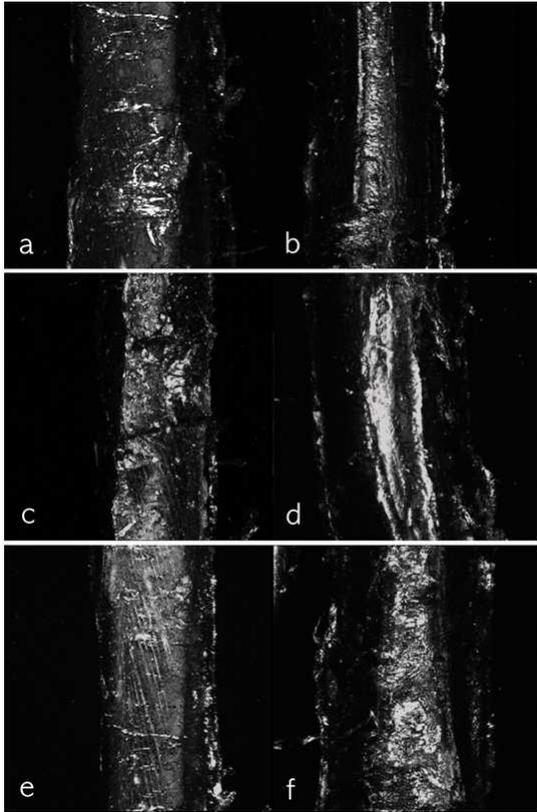


Fig. 5. Morphological differences between TMP and recycled TMP fiber by CRM. a, c, and e) virgin fibers; b, d, and f) recycled TMP fibers. The virgin fibers showed rough surface on the outer part of the fiber (middle lamella side), but the recycled TMP fibers showed much more morphological changes inner part of the fiber (lumen side).

세포벽 구조의 심한 변형으로 인해 외부표면에서 발생한 반사 신호가 상대적으로 약하게 나타난 것으로 생각되었다.

CRM을 이용하여 네 가지 섬유(Kajaani 섬유, Whatman

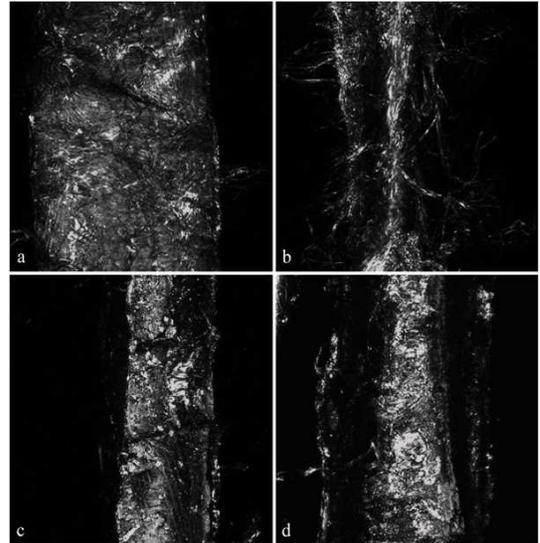


Fig. 6. MIP images of external fibrillation of different types of fibers. a) Kajaani reference fiber for FiberLab (Metso), b) Whatman filter paper, c) TMP, and d) recycled TMP fiber.

섬유, TMP 섬유, 재활용 TMP 섬유)의 외부소섬유화의 차이를 육안으로 확인할 수 있었다(Fig. 6). Kajaani 섬유(Fig. 6a)는 직경이 매우 큰 편이었으나 외부소섬유화 보다는 세포벽의 변형이 더 쉽게 관찰되었다. 반면 Whatman 섬유(Fig. 6b)는 소섬유화가 매우 많이 진행되어 있었고 세포벽은 거의 형태를 확인하기 힘든 정도였다. TMP 섬유(Fig. 6a)의 경우 재활용 TMP 섬유(Fig. 6d)의 세포벽이 원래 TMP 섬유에 비해 많은 손상이 있었음을 관찰할 수 있었다.

이러한 섬유의 소섬유화는 비표면적에서도 확인할 수 있었는데(Table 1), Whatman 섬유의 비표면적이 가장 크게(3.653) 나타났으며, Kajaani 섬유가 가장 낮게(2.389) 나타났다. 이러한 경향은 외부소섬유화의 정도가 높을수록 비표면적이 증가할 것이라는 이론적인

Table 1. Surface characteristics of different types of fibers

Fiber	Rq	Rt	VF	SA:V
Kajaani Fiber	11.75	60.68	0.127	2.389
Whatman Filter	15.47	66.57	0.088	3.653
TMP-Virgin	32.18	134.09	0.094	2.645
TMP-Recycled	39.64	148.95	0.172	2.559

Rq(Root Mean Square of Height Profile), Rt (Total height of profile), VF (Volume fraction), and SA:V(Surface Area to Volume Ratio).

예측에 부합하는 결과이다. CRM 이미지에서는 TMP 섬유의 표면에 비해 Kajaani 섬유의 표면에서 뭉쳐있는 구조가 많이 발견되었으며, TMP 섬유의 표면은 날카롭게 돌출된 형태가 많이 관찰되었다. 이러한 섬유 표면의 특징이 비표면적 값을 계산할 때 영향을 주었을 것으로 판단되었다. Kajaani 섬유의 비표면적이 TMP 섬유의 비표면적에 비해 작게 나타난 이유에 대해서 비표면적의 차이가 실제 섬유 표면의 특징에 의한 것인지를 확인할 필요가 있다.

TMP 섬유들의 경우에는 비표면적의 차이가 크지 않았지만 부피비율에서는 상당히 큰 차이(TMP 섬유: 0.094, 재활용 TMP 섬유: 0.172)를 나타냈다. 이러한 차이는 반사된 신호의 양이 TMP의 세포벽에서 보다 재활용 TMP에서 더 많았기 때문으로 판단된다. 재활용 TMP 세포벽에서 반사된 신호의 양이 더 많은 이유는 세포벽의 구조 변형으로 인해 반사면을 형성하는 세포벽의 미세 구조가 늘어났기 때문이다. 또한, 변형이 발생한 세포벽은 섬유의 부피를 증가시키는 효과가 있으며, 결과적으로 동일한 크기의 섬유라고 하여도 세포벽의 변형이 심하게 발생한 섬유의 부피가 더 크게 계산된 것이다. 이에 반해서 외부소섬유화는 많이 진행되지 않았으므로 비표면적은 크게 증가하지 않은 것으로 판단되었다.

ImageJ의 EDF, SurfCharJ 플러그인으로 계산한 거칠기(Rq)는 비슷한 외부형태를 가지는 섬유(Kajaani 섬유와 Whatman 섬유, TMP 섬유와 재활용 TMP 섬유) 간의 거칠기를 비교할 때 사용할 수 있었다. Kajaani 섬유(Rq: 11.75)는 Whatman 섬유(Rq: 15.47)에 비해 거칠기 값이 낮았는데, 이것은 이미지에서 확인할 수 있는 두 섬유간의 거칠기 차이와 일치하는 경향을 보였으므로 섬유의 외부소섬유화의 평가 지표로 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

하지만, Rq 값은 외부형태의 차이가 큰 경우에는 적용할 수 없었다. Table 1의 거칠기 값을 살펴보면, Kajaani, Whatman 섬유의 거칠기(Rq: 11.75, 15.47)가 TMP 섬유의 거칠기(Rq: 32.18, 39.64) 보다 낮게 나타났다. 이러한 거칠기의 차이는 CRM 이미지에서 관찰되는 경향과 일치하지 않았다. 이것은 EDF 플러그인을 이용하여 3차원 형태의 섬유를 높이 값을 가지는 2차원 데이터로 변환시키는 과정에서 발생한 것으로 판단되었다. TMP 섬유는 원통형의 형태를 유지하고 있었기 때

문에 높이 값을 추출할 때 높낮이 차이가 납작한 형태의 Kajaani, Whatman 섬유의 경우보다 높낮이 차이가 심하게 나타났을 것으로 판단된다. 따라서, Rq 값만으로는 Kajaani, Whatman 섬유와 TMP 섬유의 외부소섬유화를 직접 비교할 수 없음을 알 수 있었다.

TMP 섬유의 거칠기를 좀 더 정확하게 계산하려면 섬유의 내강의 곡면을 거칠기를 계산의 기준면으로 설정할 수 있어야 한다. 차후 추가적인 연구를 통해 원통에 가까운 형태를 유지하는 섬유의 거칠기를 계산하는 방법을 개발한다면 거칠기 값을 이용하여 다양한 형태의 섬유의 외부소섬유화의 정도를 비교 분석하는데 활용할 수 있을 것이다.

4. 결론

본 연구에서는 공초점반사현미경법(CRM)이 섬유의 외부소섬유화의 정도를 분석하는데 적용될 수 있는지를 평가하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CRM은 섬유의 표면 형태를 잘 보여줄 수 있는 방법이며, CLSM은 섬유의 전체적인 형태를 잘 보여줄 수 있는 방법이었다.
2. CRM으로 주로 TMP 섬유의 내강 쪽 표면과 중간층 쪽 표면의 형상을 관찰할 수 있었으며, 대부분의 신호가 세포벽의 표면에 분포하는 것으로 나타났다. Kajaani, Whatman 섬유에서는 섬유의 모든 부분의 형상을 관찰할 수 있는 것으로 나타났다. 따라서, 섬유의 외부소섬유화의 정도를 평가하기 위한 화상 획득의 방법으로써 CRM이 유용하다는 것을 확인할 수 있었다.
3. CRM 이미지를 이용하여 Kajaani 섬유, Whatman 섬유, TMP 섬유, 재활용 TMP 섬유의 외부형태를 관찰한 결과, Kajaani, Whatman 섬유는 납작한 형태로 외부소섬유화의 정도가 높게 나타났다. TMP 섬유는 중간층 쪽 표면의 형태가 잘 드러났으며 세포벽의 MF 방향으로 생성된 균열을 관찰할 수 있었다. 재활용 TMP 섬유에서는 중간층 쪽 표면의 변형과 더불어 내강쪽의 변형 및 세포벽 자체의 변형을 관찰할 수 있었다.
4. 섬유간의 외부소섬유화를 객관적으로 평가하기 위해 비표면적, 부피비율, 거칠기를 이용하여 섬유의 외부소섬유화 정도를 정량적으로 평가할 수 있는 가

능성을 확인하였다.

결론적으로 CRM을 이용하여 획득한 3차원 이미지와 그로부터 재구성된 3차원 이미지에서 계산한 비표면적, 부피비율, 거칠기를 이용하여 섬유의 외부소섬유화를 정량적으로 평가할 수 있었으며, 앞으로 다양한 조건에서 생산된 섬유의 외부소섬유화의 정도와 섬유 및 종이의 재질에 미치는 영향을 분석하는데 유용하게 사용될 수 있는 방법으로 판단되었다.

Literature Cited

- Hartman, R. R., Mechanical Treatment of Pulp Fibers for Paper Property Development. Doctoral Thesis, Doctoral thesis, The Institute of Paper Science and Technology, Lawrence University, Appleton, Wisconsin (1984).
- Kang, T., and Paulapuro, H., Effect of external fibrillation on paper strength, *Pulp & Paper Canada* 107(7/8):51-54(2006).
- Kang, T., Role of external fibrillation in pulp and paper properties, Doctoral thesis, Department of Forest Products Technology, Helsinki University of Technology, Espoo, Finland (2007).
- Kim, C. H., and Wadhams, K. R., Use of modern microscopes in analyzing fiber and paper properties(I), *Journal of Korea TAPPI* 30(1):7-17(1998).
- Seo, Y. B., Kim, D., Lee, J. H., and Jeon, Y., Mechanical impact treatment treatment on pulp fibers and their handsheet properties, *Journal of Korea TAPPI* 34(5):56-62(2002).
- Won, J. M., Effect of internal fibrillation on the paper properties, *Journal of Korea TAPPI* 35(1):1-6(2003).
- Wang, X., Improving the papermaking properties of Kraft pulp by controlling hornification and internal fibrillation, Doctoral thesis, Laboratory of Paper and Printing Technology, Helsinki University of Technology, Espoo, Finland(2006).
- Won, J. M. and Lee, J. H., Quantitative characterization of internal fibrillation of pulp fiber, *Journal of Korea TAPPI* 39(1):1-7(2007).
- Yoon, S.-H., Lee, Y.-S., Kim, T.-Y., and Kim, J.-Y., The separated refining system for cotton staple and linter fibers: refining efficiency and paper properties, *Journal of Korea TAPPI* 35(4):8-16(2003).
- Jang, H-S, and Park, J-M, Characteristics of stock drainage on refining load and analysis of drainage factors, *Journal of Korea TAPPI* 36(2):10-16(2004).
- Walsh, F. L. and Banerjee, S., An isotopic study of the effects of refining on fiber, Pan Pacific Conference (2006). à page number.
- Moran, A., The investigation of wet fiber structures using an ESEM. M. Sc. Thesis. Dept. of Paper Science. UMIST (1992).
- Mosss, P. A., Kropholler, H. W. and Sheffield, E., LTSEM-great potential for pulp evaluation. *Paper Technology* 30(9):IX12~IX14(1989).
- Jang, H. F., Robertson, A. G. and Seth, R. S., Optical sectioning of pulp fibers with Confocal Scanning Laser Microscopy. *Tappi 1991 International Paper Physics Conference: 277~279(1991)*.
- Kim, C. H. and Wadhams, K. R., Use of modern microscopes in analyzing fiber and paper properties(I), *Journal of Korea TAPPI* 30(1):7-17(1998).
- Kim, Chul-Hwan and Wadhams, R. Keith, Use of modern microscope in analyzing fiber and paper properties (II), *Journal of Korea TAPPI* 31(3):60-67 (1999).
- Kim, S.-H., Park, J.-M., and Kim, C.-H., Effects of fiber wall thickness on paper properties using CLSM, *Journal of Korea TAPPI* 31(1):39-44(1999).
- Kim, S.-H., Park, J.-M., and Kim, C.-H., Analysis of effects of fiber's collapse index on physical properties of paper using CLSM, *Journal of Korea TAPPI* 31(1):46-51(1999).
- Lee, H. L., Kim, C. H., Youn, H. J., and Jung, T. M., Studies on the densification of recycled sheet structure with thermal image analysis and CLSM, *Journal of Korea TAPPI* 31(4):8-15(1999).
- Jo, J. Y., Min, C. K., and Lee, S. H., Comparison of the morphological properties of the traditional handmade papers using CLSM, *Journal of Korea TAPPI* 32(4):87-94(2000).
- Jeong, S.-H., and Cho, N.-S., Study of morphology and physical properties of Indian Mallow(*Abutilo navicennae* Gaertner) fibers by CLSM(I), *Journal of Korea TAPPI* 34(2):61-66(2002).
- Paddock, S., Confocal reflection microscopy: The

- “other” confocal mode, *Biotechniques* 32(2):274-278 (2002).
23. Bernas, T., and Dobrucki, J. W., Backscattered light confocal imaging of intracellular MTT-formazan crystals, *Microscopy Research Technique* 64(2):126-134 (2004).
24. Donaldson, L., and Frankland, A., Ultrastructure of iodine treated wood, *Holzforschung* 58(3):219-225 (2004).
25. Batchelor, W.J., Conn, A.B., and Parker, I.H., Measuring the fibril angle of fibres using confocal microscopy. *Appita Journal* 50(5):377-380 (1997).
26. Donaldson, L. and Frankland, A., Ultrastructure of iodine treated wood. *Holzforschung* 58(3):219-225 (2004).
27. Sedighi-Gilani, M., Sunderland, H., and Navi, P., Microfibril angle non-uniformities within normal and compression wood tracheids. *Wood Science and Technology* 39(6):419-430 (2005).
28. Donaldson, L. A., Grace, J., Downes, G. M., Within-tree variation in anatomical properties of compression wood in radiate pine, *IAWA Journal* 25(3):253-271 (2004).
29. Donaldson, L. A., Singh, A. P., Yoshinaga, A., Takabe, K., Lignin distribution in mild compression wood of *Pinus radiata* D. Don., *Canadian Journal of Botany* 77(1):41-50 (1999).
30. Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W., NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9(7):671-675 (2012).
31. Doube, M., Klosowski, M. M., Arganda-Carreras, I., Cordelières, F., Dougherty, R. P., Jackson, J., Schmid, B., Hutchinson, J. R., and Shefelbine, S. J., BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone* 47(6):1076-1079 (2010).
32. Forster, B., Van de Ville, D., Berent, J., Sage, D., and Unser, M., Complex wavelets for extended depth-of-field: A new method for the fusion of multichannel microscopy images. *Microscopy Research and Technique* 65(1-2):33-42 (2004).
33. Chinga, G., Johnssen, P.O., Dougherty, R., Lunden-Berli, E. and Walter, J., Quantification of the 3D microstructure of SC surfaces. *Journal of Microscopy* 227(3): 254-265 (2007).