

친환경 효소 전처리와 고압균질 공정을 융합한 나노셀룰로스 제조 공정 연구

윤철민 · 전경수 · 정용일[†]

한국섬유기계융합연구원 그린소재연구센터

Nanocellulose Preparation via Eco-friendly Enzymatic Pretreatment and High Pressure Homogenizer

Chulmin Youn, Kyung Soo Jeon, and Yong-II Chung[†]

Green Materials Research Division, Korea Textile Machinery Convergence Research Institute, Gyeongsan 38478, Korea

Abstract: Nanocellulose has attracted growing attention in recent years due to its renewable origin, excellent mechanical properties, and wide applicability in various fields such as packaging, biomedical materials, and electronics. In the manufacturing process of nanocellulose, pretreatment is essential to determining the efficiency and quality of the final product. Among these, enzymatic hydrolysis is considered a more environmentally friendly alternative. In this study, we employed a pretreatment method using a mixed enzyme system composed of three types of cellulase enzymes to improve sustainability in nanocellulose production. The nanofibrillation process was performed using a high-pressure homogenizer, which is widely recognized for its effectiveness in producing uniform nanocellulose. Furthermore, the effects of various conditions during enzymatic pretreatment and nanofibrillation on the surface morphology and crystalline structure of pulp were investigated. In particular, the effects of enzyme amount on the crystallinity and surface morphology of the pulp were analyzed using XRD and SEM. The enzymatically pretreated pulp subjected to high-pressure homogenization resulted in nanocellulose with an average diameter of approximately 16 nm. The results emphasize that the degree of enzymatic activity significantly enhances the crystallinity of the pulp, thereby affecting the properties of the nanocellulose.

[†]Corresponding Author: Yong-II Chung
E-mail: gomer74@kotmi.re.kr

Received August 26, 2025
Revised October 2, 2025
Accepted October 25, 2025

© 2025 The Korean Fiber Society

Keywords: nanocellulose, enzyme treatment, high pressure homogenizer

1. 서 론

나노셀룰로스(nanocellulose)는 식물성 바이오매스에서 유래한 친환경 고분자 소재로, 수 나노미터 직경의 셀룰로스 섬유로 구성된다. 이는 주로 목재, 농업 부산물, 식물성 잔재 등 재생 가능한 자원에서 추출되며, 높은 기계적 강도, 생체 적합성, 경량성, 친수성, 생분해성 등의 특징을 지니고 있다. 목질계나 비목질계 나노셀룰로스는 크게 셀룰로스 나노섬유(cellulose nanofibers, CNF), 셀룰로스 나노결정(cellulose nanocrystals, CNC)로 분류된다[1]. 나노셀룰로스는 기본적으로 β -1,4-glucosidic 결합으로 연결된 D-글루코스 단위로 이루어져 있으며, 결정 영역과 비결정 영역이 혼

재된 형태를 보인다[1,2]. 이러한 구조적 특성으로 인해 나노셀룰로스는 강도보강재, 기능성 필름, 복합소재, 생체재료 등 다양한 산업 분야에서 활용 가능성이 매우 높은 신소재이다.

바이오매스 원재료로부터 나노셀룰로스를 효과적으로 제조하기 위해서는 고순도의 셀룰로스를 추출하는 공정이 필수적이다. 그러나, 고순도의 셀룰로스를 추출하기 위한 증해 및 표백 공정은 리그닌과 헤미셀룰로스를 제거하면서 과량의 오폐수가 발생하는 단점이 있다[3]. 따라서, 셀룰로스 함량이 높은 정제된 원재료(주로 펄프)를 활용하여 나노셀룰로스를 제조하는 방법이 선호되고 있다.

고순도의 셀룰로스 원재료는 전처리 공정을 통해 셀룰로

스 간의 수소결합을 약화시켜 기계적 처리 효율을 향상시키는 역할을 한다. 대표적인 전처리 방법에는 TEMPO(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) 산화법[4], 알칼리 처리[3], 산 가수분해[5], 그리고 효소 처리법[6,7]이 있다. TEMPO 산화법은 셀룰로스의 C6 하이드록실기를 카르복실기로 선택적으로 산화시켜 음전하를 부여함으로써 섬유간 응집을 방지하고 나노화 효율을 높인다. 그러나, 이 공정은 잔류 화학물질 처리 및 폐수 문제 등 환경적 단점이 있다. 이에 따라 보다 지속가능하고 친환경적인 대안으로 효소 기반 전처리법이 주목받고 있다.

효소 전처리는 셀룰로스를 선택적으로 분해하는 셀룰라아제(cellulase) 계열의 효소를 이용하여 섬유 구조를 미세하게 조절하는 생물학적 처리법이다[6]. 셀룰라아제는 주로 엔도글루카나아제(endoglucanase), 엑소글루카나아제(exoglucanase), β -글루코시다아제(β -glucosidase)로 구성되며, 각각 셀룰로스의 내부, 말단, 올리고당 구조를 선택적으로 절단한다[4]. 효소 전처리는 화학 처리와 달리 유독성 물질을 사용하지 않고 공정 온도는 상대적으로 낮아 에너지 소모와 환경 영향을 줄일 수 있다.

또한, 최근 전 세계적으로 셀룰로스 함량이 높은 섬유 폐기물과 농산 부산물을 활용한 고부가가치의 나노섬유 제조에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 특히, 식용 등급의 원재료와 식용 등급의 용매와 효소를 활용한 전처리 공정은 식용 가능한 셀룰로스 식이섬유를 개발이 가능하다. 곡물 껍질, 과일박, 식물 잔사 등과 같은 농산 부산물은 풍부한 셀룰로스를 함유하고 있어, 이를 기능성 식이섬유나 식품첨가용 바이오 소재로 전환하면 자원순환형 소재를 확보할 수 있어 탄소중립에 큰 이바지를 할 것으로 예측되어 기후환경 측면에서 연구 수요가 증가하고 있는 실정이다[8-10].

나노셀룰로스를 만들기 위해 필수적인 공정은 높은 기계적 전단력이나 충격을 유도하는 습식 콜로이드 밀, 고압균질기(high pressure homogenizer) 장치를 활용해야 한다. 습식 콜로이드 밀은 상단과 하단에 있는 세라믹이나 금속 디스크를 통과하며 전단력을 받으며 분쇄하는 장치이고, 고압균질기는 강한 압력(1,000 bar 이상)으로 미세 노즐을 통과하며 유체가 강한 충격을 하며 분산하는 장치로 나노셀룰로스를 제조하는 장치로 주로 사용되고 있다. 그러나, 단순히 기계적 처리만을 이용해서 나노셀룰로스를 제조하려면 생산 비용과 시간이 많이 요구되어 앞서 서술한 전처리 공정과 연계하는 방안이 연구되고 있다[2,4,7].

전처리된 원재료는 습식 고압균질기를 통해 나노섬유화된다. 고압균질기는 고압에서 슬러리를 미세한 노즐을 통과시키며, 극한의 전단력과 충돌력을 이용해 나노 크기로 분산한다[4]. 고압균질의 처리 횟수와 압력 조건에 따라 나노섬유의 직경 및 길이, 분산 안정성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 특히, 효소 전처리와 병행할 경우 섬유

간 결합력이 약화되어 나노화 효율이 비약적으로 증가한다[3,6]. 이러한 제조 공정은 화학 처리 없이도 고품질의 나노셀룰로스를 제조할 수 있는 유망한 기술로, 대량 생산에도 적용가능한 장점을 지니고 있다.

본 연구에서는 나노셀룰로스 생산의 지속가능성을 높이기 위해 식용 가능한 셀룰라아제계 효소를 사용한 전처리 공정에 관한 연구를 진행하였다. 효소 전처리 과정에서 효소의 첨가량에 따른 펄프 표면에서 발생하는 섬유 표면의 변화를 분석하였고, 효소 전처리된 펄프는 습식 콜로이드 밀에 의한 강한 전단력에 의한 펄프의 미세섬유화에 대한 매커니즘을 규명하고, 고압균질기 처리로 제조된 나노셀룰로스에 대한 직경 분석을 실시하였다. 따라서, 식용 등급의 효소를 사용한 전처리 조건이 펄프를 나노셀룰로스를 제조하기에 적합하다는 가능성을 제시하였다. 이를 바탕으로 펄프 뿐만 아니라, 셀룰로스 함량이 높은 식용 등급의 원재료, 농부산물에 대해서 고부가가치의 재자원화를 위한 전처리 및 나노화 공정을 제시하여 자원순환형 소재화에 대한 연구를 실시하였다.

2. 실험

본 연구에서는 나노셀룰로스를 제조하는 원재료로 크라프트 소프트우드 펄프를 사용하였다. 크라프트 소프트우드 펄프는 증류수에 4%로 첨가하여 고해기를 이용해 30분간 교반시켜 충분히 섬유를 풀어주었고, 효소 전처리 공정은 식품등급의 셀룰라아제계 효소(Celluclast BG, Novozymes)를 사용하였으며, 효소 반응은 50 mM sodium acetate monohydrate 버퍼 용액내에서 수행하였다. 반응 용액의 pH는 빙초산을 이용하여 5.0으로 조절하였다. 이후 혼합액을 진탕배양기에서 150 rpm으로 50 °C에서 8시간 반응시켜 효소 전처리를 진행하였다. 반응 종료 후, 효소를 불활성화하기 위해 20분간 100 °C에서 가열하였으며, 효소 잔여물을 제거하기 위해 감압여과기를 이용하여 증류수로 3회 세척하여 전처리된 펄프 분산액을 확보하였다.

효소 양에 따른 펄프 표면 손상 여부를 파악하기 위한 실험은 10 ml의 증류수에 4%의 펄프를 첨가한 분산액에 효소를 unit(기재 대비 wt%)별로 다음과 같이 효소 전처리를 실시하였다. 1 unit (0.07 wt%), 2 unit (0.13 wt%), 3 unit (0.2 wt%), 4 unit (0.27 wt%), 9 unit (0.62 wt), 18 unit (1.25 wt%), 36 unit(2.5 wt%)로 효소 양을 다르게 전처리하고, 효소 첨가량에 따른 펄프의 표면구조와 결정화도를 비교 분석하였다.

효소 전처리 후 나노화 수준을 분석하기 위한 실험 조건은 10 l의 증류수에 4%의 펄프를 첨가하는 대용량으로 별도의 실험을 진행하였다. 효소 전처리 시 효소의 양은 펄프 대비 1.25 wt%만큼 첨가하고, 나머지 조건은 동일하게

진행하였다. 효소 전처리한 분산액은 습식 콜로이드밀 장치를 이용해 순환식으로 10회를 통과시켜 1단계 나노화처리를 하였고, 이후 분산액을 증류수 20 l에 1단계 나노화 시료를 1% 분산하여 고압균질기(NH4000, 일신오토클레이브)를 이용해 1,300 bar에서 분당 4 l의 처리속도로 노즐(직경 100 μm)을 1-5회 통과시켜 결정구조를 분석하였고, 5회 통과한 시료로 전자현미경 분석을 통해 표면구조와 평균 직경을 분석하였다.

각 공정단계별 시료의 전자현미경 분석(FE-SEM)은 S4800(Hitachi, 일본)을 이용하여 표면구조를 분석하였다. 분석 전, 시료의 전도성을 확보하기 위해 금을 이용한 스퍼터링 코팅을 실시하여 약 10 nm 두께로 균일하게 증착하였다. 결정구조 분석(XRD)은 XPERT PRO(PANalytic, 영국)를 이용하여 분석하였다. 시료는 분산액을 유리 위에 코팅하여 준비하였으며, 측정 범위는 5°에서 35°(2θ 기준)로 설정하였고 측정 속도는 분당 1°로 측정하였다. 투과전자현미경(TEM) 분석은 BIO-TEM JEM-1011 (JEOL, 일본) 장비를 이용하여 수행하였다. TEM 시료는 나노셀룰로스 분산액을 0.01 wt%로 희석한 후 TEM 그리드 위에 약 5 μl를 떨어뜨려 상온에서 자연건조시켜 준비하였다. 시료의 미세구조를 명확히 관찰하기 위해 우라닐 아세테이트(2 wt%) 용액을 이용한 네거티브 염색을 실시하였다. 염색은 시료 건조 후 1분간 처리한 뒤 증류수로 가볍게 세척하여 과잉 염색제를 제거하였다.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서는 효소 전처리 공정과 나노화 공정을 이용해 크라프트 소프트우드 펄프를 나노셀룰로스로 제조하였

다(Figure 1). 원재료인 크라프트 소프트우드 펄프는 직경이 약 15-20 μm인 단섬유가 압축되어 있는 형태이다. 압축된 펄프는 효소의 반응성을 향상시키기 위해 펄퍼를 이용하여 물에 고르게 분산시켰다[11]. 크라프트 소프트우드 펄프는 셀룰로스 함량이 약 90%로 이루어져 있어 셀룰라아제 계열의 효소를 사용하여 효소 전처리 공정을 실시하였다. 셀룰라아제 복합 효소는 엔도글루카나아제(endoglucanase), 셀로바이오하이드로라아제(cellobiohydrolase), 베타-글루코시다아제(β-glucosidase)로 구성된다[2]. 엔도글루카나아제는 셀룰로스 분자의 무작위적인 내부 비결정 영역의 β-1,4-글루코시드 결합을 절단함으로써 다당류 사슬을 끊어 짧게 만든다[1,6]. 이로 인해 셀룰로스 구조의 응집력이 감소하며, 나노화 공정 시 섬유의 기계적 분해가 용이해진다. 엑소글루카나아제는 셀룰로스 사슬의 말단부에 작용하여 셀로비오스 단위체를 연속적으로 절단한다. 이러한 작용은 결정 영역에서도 일부 진행되며, 전체 섬유의 중합도를 효과적으로 저하시킨다. β-글루코시다아제는 셀로비오스를 포도당으로 전환하여 반응 생성물이 축적되지 않도록 하고, 전체 셀룰라아제 시스템의 활성도를 유지하는데 중요한 역할을 한다. 이와 같은 3단계 연쇄 작용 매커니즘은 셀룰로스 섬유 간 수소결합 네트워크를 효율적으로 약화시키며, 나노화 처리 효율을 현저히 증가시킨다.

효소 전처리의 효과를 분석하기 위해 효소의 양을 증가 시킴에 따른 결정화도 분석을 실시하였다(Figure 2(a)). 결정화도(crystallinity index, CI)는 Segal 방법을 이용하여 계산하였다. Segal 식은 셀룰로스의 (002)면에서 나타나는 최대 회절강도(I_{002})와 비결정 영역의 최소 회절강도(I_{am})의 차이를 이용해 결정성 비율을 정량화하는 방식으로, 다음 식 (1)에 따라 산출하였다[12].

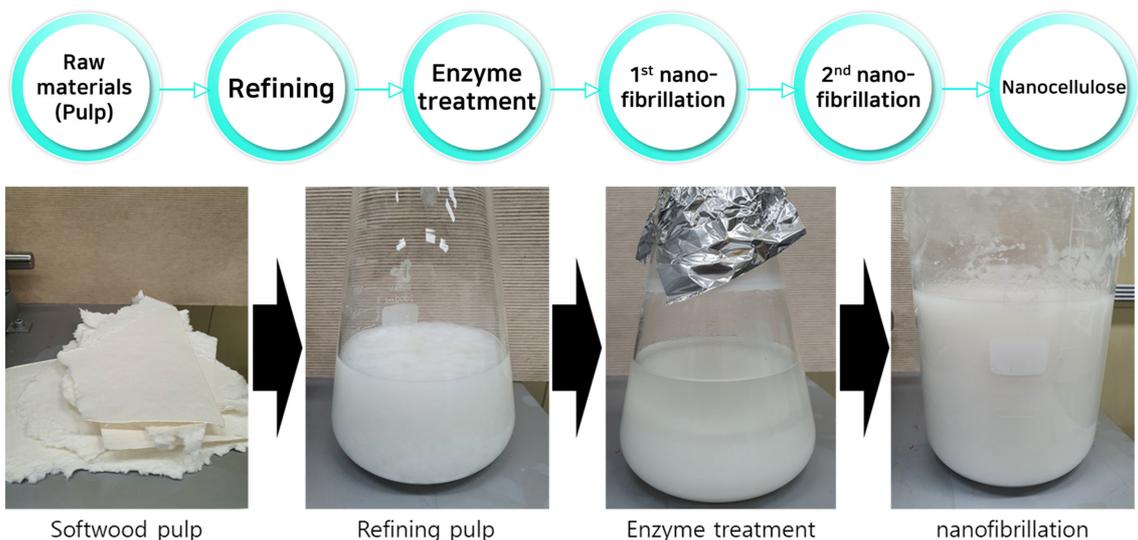


Figure 1. Process schematic and photographs of the overall procedure for producing nanocellulose from softwood pulp.

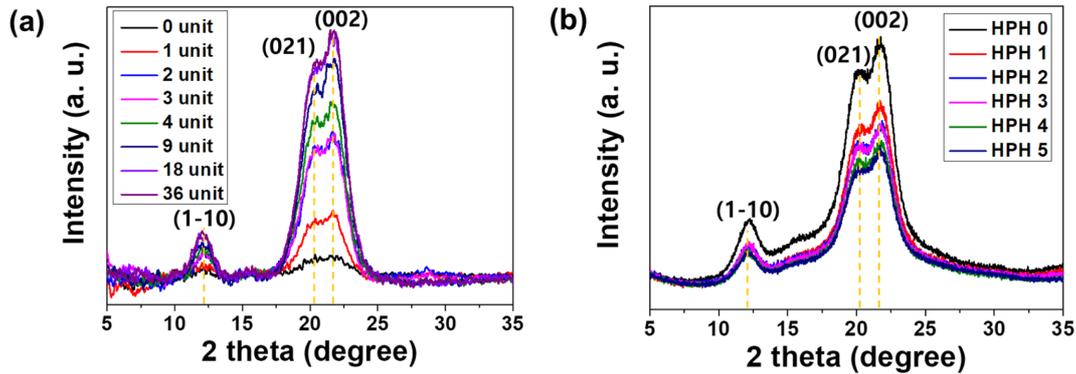


Figure 2. (a) Crystallinity index analysis according to the enzyme unit used during the enzymatic pretreatment process and (b) crystallinity index analysis of enzymatically pretreated samples according to the number of high-pressure homogenization cycles.

$$CI (\%) = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100 \quad (1)$$

여기서 I_{002} 는 약 $22.5^\circ(2\theta)$ 부근에서 나타나는 셀룰로스의 결정 영역의 최대 강도이며, I_{am} 은 약 $18^\circ(2\theta)$ 부근에서 나타나는 비결정 영역의 최소 강도이다.

효소 첨가량을 0, 1, 2, 3, 4, 9, 18, 36 unit으로 증가시키면서 셀룰로스의 주요 회절 강도인 (1-10)과 (002)면을 주목하여 결정화도를 분석하였다. 효소 첨가량에 따른 결정화도는 각각 0 unit은 15.3%, 1 unit은 34.1%, 2 unit은 47.3%, 3 unit은 48.3%, 4 unit은 49.3%, 9 unit은 52.7%, 18 unit은 54.6%, 36 unit은 55.7%로 분석되었다. 효소 유닛 수가 증가함에 따라 (1-10) 및 (002) 회절 강도의 상대적인 세기가 현저히 증가하였다[13,14]. 무처리군(0 unit)에서는 (002)면의 피크는 거의 나타나지 않은 넓은 형태로 나타났고, 효소 양이 증가할수록 피크가 점차 커지는 것으로 나타났으며, 18 unit과 36 unit은 차이가 거의 나타나지 않았다. 이는 효소에 의한 비결정 영역의 선택적 분해가 결정 영역의 상대적인 비율을 증가시킨 결과로 판단되며, 일정 수준 이상에서는 분해에 한계가 있음을 나타내고 있다.

효소 전처리한 시료에 대해 습식 콜로이드밀 장치로 1차 나노화하고 고압균질기를 이용해 2차 나노화 처리를 하여 얻어진 나노셀룰로스의 결정화도를 처리 횟수에 따라 분석하였다(Figure 2(b)). 고압균질기 처리 횟수에 따라 결정화도는 0회는 65.3%, 1회는 63.9%, 2회는 63.5%, 3회는 62.6%, 4회는 62.6%, 5회는 60.6%로 점진적으로 감소하는 경향을 볼 수 있다[15]. 이러한 감소는 고압균질기의 강한 압력(1,300 bar)으로 인해 셀룰로스 결정 영역이 강한 기계적 전단력과 충돌에 의해 부분적으로 파괴되거나 무정형화가 되었음을 나타낸다[5,16].

Figure 3은 전자현미경(FE-SEM)을 통해 효소 첨가량(0, 1, 2, 3, 4, 9, 18, 36 unit)에 따른 소프트우드 펄프의 표면 미세구조 변화를 정성적·정량적으로 병행하여 분석하였다.

효소 첨가량이 증가함에 따라 펄프의 평탄한 표면이 점차 와해되며, 미세한 섬유상이 노출되는 경향이 뚜렷하게 관찰되었다. 특히 3 unit 이하의 저농도의 효소 처리 조건에서는 부분적인 표면개질만이 이루어졌으나, 9 unit 이상에서는 펄프 표면의 구조가 더 많은 손상이 발생하였다.

Figure 3에서 좌측 사진들은 효소 전처리에 따른 소프트우드 펄프의 표면 거칠기 변화를 정량적으로 분석한 자료이다. 전자현미경 사진 상에서 섬유의 주방향을 따라 라인 프로파일을 설정하고 평균 거칠기(R_a) 및 제곱평균거칠기(R_q) 값을 산출하였다. R_a 와 R_q 는 각각 표면의 평균 높이편차와 제곱평균편차를 나타내며, 값이 증가할수록 표면 요철이 심한 정도를 의미한다[17].

효소 첨가량에 따른 R_a 값은 0 unit에서 $3.73 \mu\text{m}$, 1 unit에서 $14.33 \mu\text{m}$, 2 unit에서 $15.63 \mu\text{m}$, 3 unit에서 $14.68 \mu\text{m}$, 4 unit에서 $28.77 \mu\text{m}$, 9 unit에서 $26.38 \mu\text{m}$, 18 unit에서 $32.79 \mu\text{m}$, 36 unit에서 $21.61 \mu\text{m}$ 로 나타났다. 이와 유사한 경향성을 보인 R_q 값은 각각 $4.61 \mu\text{m}$, $18.63 \mu\text{m}$, $21.87 \mu\text{m}$, $19.02 \mu\text{m}$, $35.11 \mu\text{m}$, $32.22 \mu\text{m}$, $38.97 \mu\text{m}$, $26.39 \mu\text{m}$ 로 측정되었다. 두 지표 모두 효소 첨가량이 증가함에 따라 전반적으로 상승하는 추세를 보이며, 이는 효소 처리에 의해 펄프 표면의 미세 피브릴이 노출되고 치밀한 섬유 다발이 점차 분리되면서 표면 요철이 심화된 결과로 해석된다[7]. 특히, 18 unit 조건에서 $R_a(32.79 \mu\text{m})$ 및 $R_q(38.97 \mu\text{m})$ 가 최대값을 나타내어, 표면 개질 효과가 가장 뚜렷하게 나타났다. 이는 효소 처리에 의해 섬유 표면의 비결정영역이 효과적으로 제거되고, 내부의 미세 섬유 구조가 균일하게 드러난 결과로 판단된다.

Figure 3에서 우측 사진들은 정성적 해석의 명확성을 높이기 위해 섬유의 높이 변화를 색상 및 윤곽선 대비로 재구성한 분석 자료이다. 이러한 가공 처리는 섬유의 요철 분포를 직관적으로 표현함으로써, 효소 첨가에 따른 표면 거칠기 증가를 독자가 시각적으로 쉽게 인지할 수 있도록 표현하였다. 특히, 붉은색 및 보라색 영역은 상대적으로 돌출

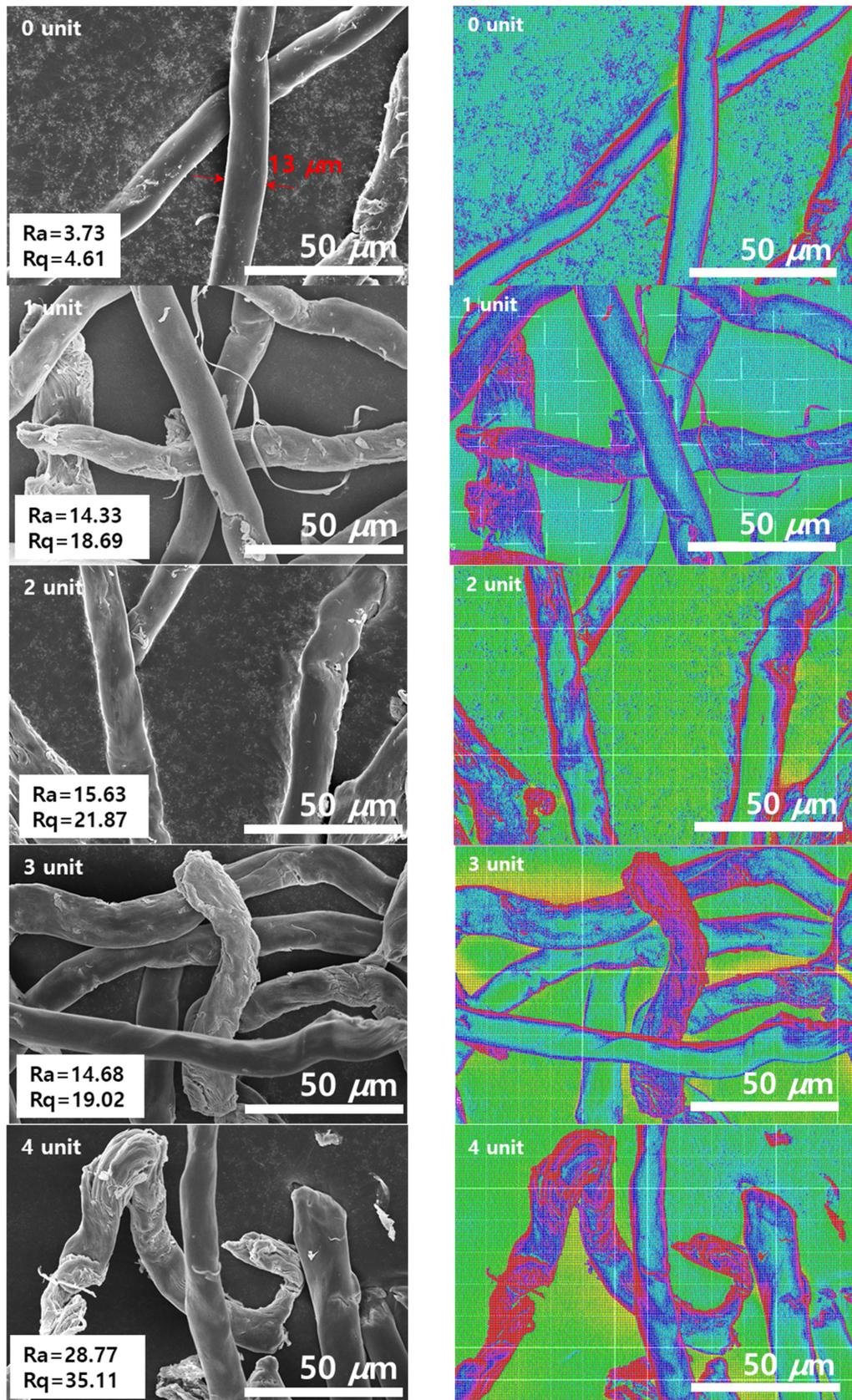


Figure 3. FE-SEM images (left) and surface-morphology analysis images (right) of softwood pulp treated with different enzyme loadings (0, 1, 2, 3, 4, 9, 18, and 36 units).

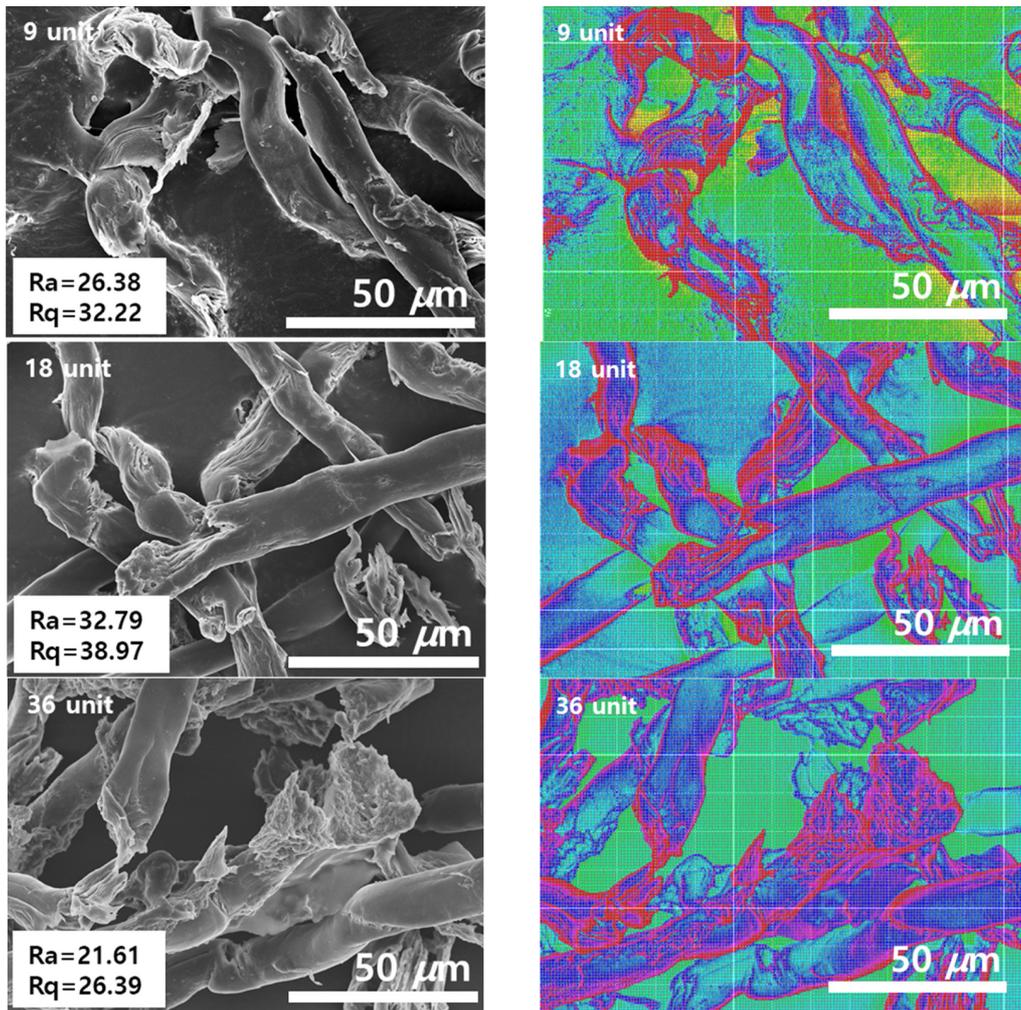


Figure 3. Continued.

된 부분, 녹색 및 청색 영역은 저지대 또는 평평한 섬유를 나타내며, 효소 첨가량이 증가할수록 대비가 뚜렷하게 나타나는 경향을 보였다.

따라서, 본 이미지는 단순한 미세구조 관찰을 넘어, 효소 처리에 의해 형성된 섬유 표면의 미세 요철과 미세섬유화 정도를 직관적으로 제시하는 보조적 정성 자료로서의 의의를 가진다. 정량적 분석 결과(R_a , R_q)와 정성적 시각화 결과가 서로 일치함으로써, 효소 첨가량이 증가할수록 펄프 표면의 미세섬유 노출이 촉진됨을 보다 명확하게 입증할 수 있었다.

결과적으로 정성적 시각화와 정량적 표면거칠기 분석을 종합하여 18 unit(기재 대비 1.25 wt%)이 펄프의 미세섬유상이 노출되는 전처리로 최적의 조건임을 확인하였다[18,19].

앞서 효소의 첨가량에 따른 펄프의 전처리 형상 변화를 통해 본 연구에서는 18 unit으로 효소 전처리한 시료에 대해 후속 실험(1단계 나노화, 2단계 나노화)을 진행하였다. 나노셀룰로스를 얻기 위해서 소프트우드 펄프의 표면 구조

가 효소에 의해 약화된 효소 처리물에 대해 1단계 나노화 공정으로 습식 콜로이드 밀 장치를 사용하였다[11,20]. 습식 콜로이드 밀 처리는 이후 2단계 나노화 공정인 고압균질기의 미세 노즐(100 μm)을 통과하기에 원활한 형태로 가공하기 위해 수행하였다.

Figure 4(a)는 효소 전처리한 소프트우드 펄프를 습식 콜로이드 밀 처리에 따른 펄프의 형상 변화에 대한 모식도이다. 습식 콜로이드 밀 장치는 전단력을 이용해 펄프의 미세섬유화를 유도하는 장치로 기계적 분쇄에 해당한다. 전처리 하지 않은 펄프에 대해서 습식 콜로이드 밀 장치만을 이용해 나노급 섬유를 만들기 위해서는 분쇄에 필요한 에너지가 많이 필요하다. 본 연구에서는 효소 전처리를 통해 펄프의 조직을 약화시키고 펄프에 강한 전단력을 반복적으로 가해 펄프의 미세섬유화를 진행하였다. 펄프는 크게 다발형 섬유와 면상형 섬유의 형태로 분쇄되며, 다발형 섬유는 전단력에 의해 표피층이 박리되며 섬유의 직경이 줄어들며, 다발에 붙어 있는 면 형태의 섬유 다발은 전단력에

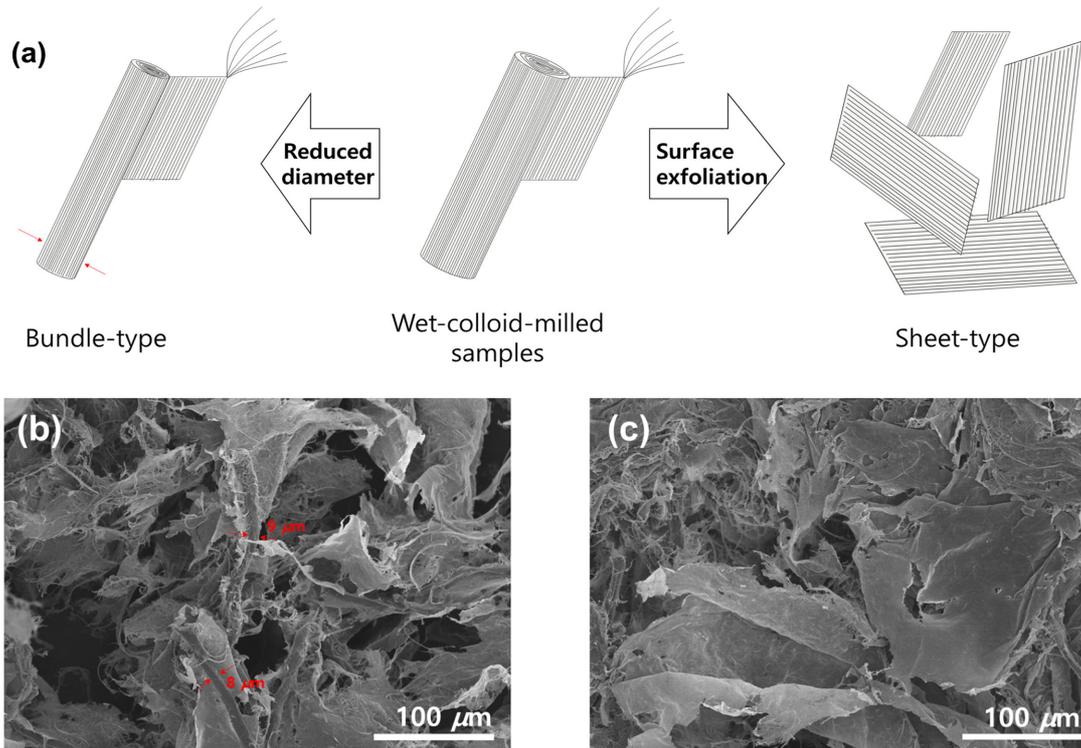


Figure 4. (a) Schematic illustration and electron microscopy images of softwood pulp pretreated with enzymes and subsequently processed by wet colloid milling (1st nanofibrillation), (b) bundle-type fibers, and (c) sheet-type fibers.

의해 떨어져 나가 독립적으로 면을 이루게 된다.

Figure 4(b)는 다발 형태로 응집된 섬유에서 표피층이 분리되는 현상을 보여주고 있다. 이는 효소 전처리에 의해 섬유의 외곽 비결정 영역이 선택적으로 분해되면서 표면층과 내부층 사이의 결합력이 약화된 것으로 해석된다. 이러한 계층적 박리 현상은 콜로이드 밀 장치의 강한 마찰력과 전단력에 의해 섬유층 사이가 분리되어 발생한 결과이며, 이후 고압균질화 공정에서 보다 효과적인 나노섬유화를 유도할 수 있는 구조적 기반을 형성한다. 초기 펄프 직경은 약 13 μm(Figure 3, 0 unit)이며, 습식 콜로이드 밀 처리한 펄프 중 다발형 섬유의 직경은 약 8-9 μm(Figure 4(b))로 분석되었다.

Figure 4(c)는 나노화된 섬유들이 서로 얽혀 면상 구조로 떨어져 나온 모습을 보여준다. 이는 습식 콜로이드 밀 장치가 섬유를 단순히 길게 찢기보다는 다발형태에서 층상으로 분리시켜 떨어져 나온 표피층이 독립적으로 형태를 이루고 있다고 해석된다. 습식 콜로이드 밀 장치는 면상 구조를 해체시킬만큼 강한 힘이 전달되지 않아 나노섬유화를 위한 2단계 나노화 공정이 필수적이다.

효소 전처리 및 콜로이드 밀 기반 1차 나노화 공정을 거친 소프트우드 펄프 시료에 대해 고압균질기를 이용한 2단계 나노섬유화 공정을 수행한 결과, 고도로 해리된 나노셀룰로스를 성공적으로 제조할 수 있었다. 이를 확인하기 위

해 FE-SEM 및 TEM 분석을 병행하였으며, 최종적으로는 섬유 직경 분포를 기반으로 한 히스토그램 분석을 통해 평균 직경이 16 nm에 달하는 나노섬유를 얻었음을 확인하였다[4,21].

Figure 5(a)는 FE-SEM 저배율 이미지로 나노화된 셀룰로스 섬유가 3차원 망상구조를 형성하고 있으며, 섬유 길이는 수 마이크로미터 이상 유지된 상태로 분산되어 있음을 보여준다. 그러나 고배율 이미지 Figure 5(b), (c)에서는 일부 섬유가 다발형태로 뭉쳐져 있으며, 섬유의 직경은 25-382 nm로 편차가 매우 크게 분석되어 개별 섬유의 직경 분석에는 한계가 있었다. 이는 고압균질화 공정의 높은 전단력에도 불구하고 나노셀룰로스가 수소결합 네트워크를 통해 상호 응집하였거나, FE-SEM 분석을 위해 시료를 준비하는 과정에서 물에 분산된 나노셀룰로스가 물이 건조하면서 응집한 것으로 추측된다.

이에 따라 보다 정확한 직경 분석을 위해 시료를 저농도로 희석한 후 TEM 분석을 실시하였으며, Figure 5(d) 및 (e) 이미지에서 개별 섬유가 균일하게 분산된 상태로 관찰되었다. TEM 분석 결과를 기반으로 한 직경 분포(Figure 5(f))는 98개의 나노셀룰로스를 분석하여 평균 약 16.3±6.2 nm의 직경을 갖는 것으로 나타났다.

이러한 수준의 나노화는 단일 고압균질화 공정만으로는 달성하기 어려우며, 본 연구에서 제안한 효소 전처리, 1단

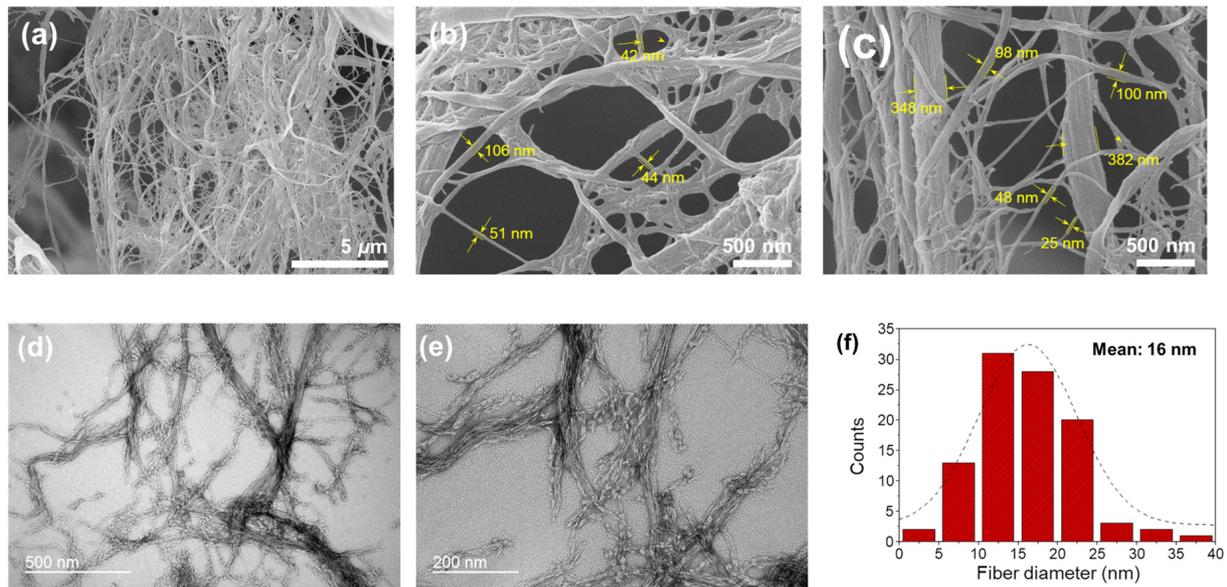


Figure 5. Electron microscopy images of enzyme-pretreated softwood pulp subjected to colloid milling (1st nanofibrillation) and high-pressure homogenization (2nd nanofibrillation); (a), (b), (c) FE-SEM images, (d), (e) TEM images, and (f) histogram of average fiber diameter.

계 나노화(콜로이드 밀), 2단계 나노화(고압균질기)의 3단계 연속 공정이 상호 보완적으로 작용했기 때문에 가능했다. 효소에 의해 약화된 섬유 구조는 습식 콜로이드 밀에서 초기 분쇄됨으로써 고압균질화의 전단력에 민감하게 반응할 수 있었고, 그 결과 고균일성의 나노섬유 생산이 가능해졌다[21].

4. 결론

본 연구에서는 소프트우드 기반 크라프트 펄프를 대상으로 식용 등급의 셀룰라아제 효소를 사용하여 효소 첨가량에 따른 펄프 표면의 구조 변화, 결정구조를 분석하여 효소 첨가량을 최적화하였으며, 습식 콜로이드 밀 처리에 의한 섬유의 형상 변화를 2가지 형태로 제시하였다. 이후 고압균질기 처리를 통해 결정구조의 변화를 분석하고, 직경이 약 16 nm 수준인 나노셀룰로스가 분석된 전자현미경 사진을 통해 균일한 나노섬유가 제조됨을 확인하였다.

먼저, 효소 첨가량은 0에서부터 36 unit 범위에서 조절된 결과, XRD 분석에서 (1-10) 및 (002) 결정면의 피크가 점진적으로 증가하는 현상이 관찰되었으며, 이는 효소가 비결정 영역을 선택적으로 분해함으로써 전체 결정화도가 향상되었다. 전자현미경으로 정량적(Ra, Rq)-정성적(표면 형상) 분석을 실시하여 효소의 첨가량이 증가할수록 섬유의 표면에 더 많은 변화가 발생하는 경향성을 분석하였다. 결정성과 전자현미경 분석을 통해 펄프에 혼재되어 있는 비정질과 결정질 영역 중 비정질 영역에 해당하는 부분이 주로 제거되어 결정화도가 점차 증가하는 것으로 볼 수 있

며, 펄프의 표면에 손상을 유도하는 것으로 확인된다.

효소 전처리한 소프트우드 펄프는 섬유의 응집과 입자의 크기가 커서 고압균질기의 미세노즐을 통과하기에 한계가 있어 습식 콜로이드 밀 장치를 이용해 1단계 나노화 공정을 실시하였다. 습식 콜로이드 밀 장치를 통과한 시료는 크게 두 종류의 형태로 미세섬유화가 이루어짐을 확인하였다. 다발형 섬유는 표피층이 점차 박리되며 섬유의 직경이 감소하였고, 면상형 섬유는 높은 전단력에 의해 면 형태로 섬유에서 분리되는 현상을 전자현미경 분석을 통해 확인하였다.

1단계 나노화 공정을 거친 시료는 고압균질기를 통해 나노셀룰로스화를 실시하였다. 고압균질기 처리 횟수에 따른 XRD 분석을 통해 결정성에 대한 영향을 분석하였다. 고압균질기의 처리 횟수가 증가할수록 결정성이 감소하는 경향이 관찰되었고, 이는 과도한 기계적 충동으로 인해 결정구조의 손상이 유도되었다. 1단계 나노화 공정과 2단계 나노화 공정을 거친 나노셀룰로스는 평균 직경이 약 16 nm인 균일한 나노섬유가 얻어짐을 확인하였다.

결론적으로, 본 연구는 식용 등급의 셀룰라아제 효소 전처리와 단계적 기계적 나노화 공정을 통해 균일한 나노셀룰로스를 제조하였다. 해당 공정은 유해한 화학 처리 없이 평균 직경 16 nm 수준의 나노섬유를 안정적으로 제조하였으며, 무독성 제조 공정으로 적용할 수 있는 친환경 식품 포장재, 바이오 복합재 등 다양한 산업 분야에서 활용 가능성이 크다. 향후에는 산업용 원재료가 아닌 식용 등급의 원재료를 활용하여 농부산물에 대한 자원순환형 재자원화 연구에 대한 연구 확장이 기대된다.

감사의 글: 이 논문은 산업통상자원부 연구개발사업의 지원을 받아 수행된 연구개발 과제(과제번호: 20018683, 연구개발과제명: 바이오매스 기반 셀룰로오스 섬유 제조 및 식용 코팅제 제품화 기술 개발)의 연구 성과 중 일부입니다. 연구비 지원에 깊이 감사드립니다.

References

- R. J. Moon, A. Martini, J. Nairn, J. Simonsen, and J. Youngblood, "Cellulose Nanomaterials Review: Structure, Properties and Nanocomposites", *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 3941–3994.
- X. Tong, Z. He, L. Zheng, H. Pande, and Y. Ni, "Enzymatic Treatment Processes for the Production of Cellulose Nanomaterials: A Review", *Carbohydr. Polym.*, 2023, **299**, 120199.
- R. D'Orsi, N. Di Fidio, C. Antonetti, A. M. Raspolli Galletti, and A. Operamolla, "Isolation of Pure Lignin and Highly Digestible Cellulose from Defatted and Steam-Exploded *Cynara Cardunculus*", *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2023, **11**, 1875–1887.
- T. Saito, S. Kimura, Y. Nishiyama, and A. Isogai, "Cellulose Nanofibers Prepared by TEMPO-Mediated Oxidation of Native Cellulose", *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 2485–2491.
- D. Klemm, F. Kramer, S. Moritz, T. Lindström, M. Ankerfors, D. Gray, and A. Dorris, "Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 5438–5466.
- D. Kumar and G. S. Murthy, "Stochastic Molecular Model of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose for Ethanol Production", *Biotechnol. Biofuels*, 2013, **6**, 63.
- M. Henriksson, G. Henriksson, L. A. Berglund, and T. Lindström, "An Environmentally Friendly Method for Enzyme-Assisted Preparation of Microfibrillated Cellulose (MFC) Nanofibers", *Eur. Polym. J.*, 2007, **43**, 3434–3441.
- S. Rashid and H. Dutta, "Characterization of Nanocellulose Extracted from Short, Medium and Long Grain Rice Husks", *Ind. Crops Prod.*, 2020, **154**, 112627.
- M. Dominic, R. Joseph, P. M. Sabura Begum, B. P. Kanoth, J. Chandra, and S. Thomas, "Green Tire Technology: Effect of Rice Husk Derived Nanocellulose (RHNC) in Replacing Carbon Black (CB) in Natural Rubber (NR) Compounding", *Carbohydr. Polym.*, 2020, **230**, 115620.
- S. Malarat, D. Khongpun, K. Limtong, N. Sinthuwong, P. Soontornapaluk, C. Sakdaronnarong, and P. Posoknistakul, "Preparation of Nanocellulose from Coffee Pulp and Its Potential as a Polymer Reinforcement", *ACS Omega*, 2023, **8**, 25122–25133.
- Y. Igarashi, A. Sato, H. Okumura, F. Nakatsubo, and H. Yano, "Manufacturing Process Centered on Dry-Pulp Direct Kneading Method Opens a Door for Commercialization of Cellulose Nanofiber Reinforced Composites", *Chem. Eng. J.*, 2018, **354**, 563–568.
- L. Segal, J. J. Creely, A. E. Martin, and C. M. Conrad, "An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer", *Text. Res. J.*, 1959, **29**, 786–794.
- K. Nobuta, H. Teramura, H. Ito, C. Hongo, H. Kawaguchi, C. Ogino, A. Kondo, and T. Nishino, "Characterization of Cellulose Nanofiber Sheets from Different Refining Processes", *Cellulose*, 2016, **23**, 403–414.
- A. Isogai and M. Usuda, "Crystallinity Indexes of Cellulosic Materials", *Seni Gakkaishi*, 1990, **46**, 324–329.
- R. S. A. Ribeiro, N. Bojorge, and N. Pereira, "Statistical Analysis of the Crystallinity Index of Nanocellulose Produced from Kraft Pulp via Controlled Enzymatic Hydrolysis", *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2020, **67**, 366–374.
- K. Daicho, T. Saito, S. Fujisawa, and A. Isogai, "The Crystallinity of Nanocellulose: Dispersion-Induced Disorder of the Grain Boundary in Biologically Structured Cellulose", *ACS Appl. Nano Mater.*, 2018, **1**, 5774–5785.
- M. Tom, S. Thomas, B. Seantier, Y. Grohens, M. Pulikaparambil Kochaidrew, R. Subramanian, T. Ranjan Mohanty, H. Vahabi, H. Joseph Maria, J. Keloth Paduvilan, and M. George Thomas, "Role of Nanocellulose Geometric Structures on the Properties of Green Natural Rubber Composites", *Express Polym. Lett.*, 2024, **18**, 638–655.
- P. Phanthong, P. Reubroycharoen, X. Hao, G. Xu, A. Abudula, and G. Guan, "Nanocellulose: Extraction and Application", *Carbon Resour. Convers.*, 2018, **1**, 32–43.
- A. M. Fontes, C. L. Pirich, G. R. O. A. Tanobe, Q. Tarrés, M. Delgado-Aguilar, and L. P. Ramos, "Micro/Nanostructured Lignonanocellulose Obtained from Steam-Exploded Sugarcane Bagasse", *Cellulose*, 2021, **28**, 10163–10182.
- Y. Qing, R. Sabo, J. Y. Zhu, U. Agarwal, Z. Cai, and Y. Wu, "A Comparative Study of Cellulose Nanofibrils Disintegrated via Multiple Processing Approaches." *Carbohydr. Polym.*, 2013, **97**, 226–234.
- Y. Ma, Q. Xia, Y. Liu, W. Chen, S. Liu, Q. Wang, Y. Liu, J. Li, and H. Yu, "Production of Nanocellulose Using Hydrated Deep Eutectic Solvent Combined with Ultrasonic Treatment", *ACS Omega*, 2019, **4**, 8539–8547.