

一株黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 对羟基磷灰石合成的诱导

何飞¹, 连宾^{2*}, 刘世荣³, 龚国洪³

¹ 贵州大学喀斯特环境与地质灾害防治教育部重点实验室, 贵阳 550003

² 中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002

³ 中国科学院地球化学研究所矿床地球化学国家重点实验室, 贵阳 550022

摘要:【目的】研究利用真菌诱导的方式合成羟基磷灰石(HAP)。【方法】采用含不同浓度 Na_2HPO_4 和 CaCO_3 的 PDA (Potato Dextrose Agar Medium) 液体培养基, 研究黑曲霉作用诱导 HAP 合成, 并用透射电镜 (TEM) 观察诱导形成的矿物晶体形态和结构、用 X 射线衍射 (XRD) 法确定矿物种类。【结果】主要研究结果如下: (1) 在含有合适浓度的 Na_2HPO_4 和 CaCO_3 的 PDA 液体培养基中, 接入黑曲霉可以诱导 HAP 晶体的合成。 (2) 黑曲霉对 HAP 合成的诱导作用跟反应时间有关, 反应时间越长, 越有利于生成 HAP。分析认为黑曲霉对 HAP 诱导作用是因其代谢产酸造成对 CaCO_3 的溶解以及菌丝体对 Ca^{2+} 的富集作用, 在菌丝球内先形成白磷钙石, 然后进一步转化为羟基磷灰石。【结论】黑曲霉在含 Na_2HPO_4 和 CaCO_3 的 PDA 液体培养基中能诱导羟基磷灰石的生成。由于黑曲霉诱导合成 HAP 的反应条件温和, 制备工艺简单, 成本低, 因此具有潜在应用前景。

关键词: 黑曲霉, 羟基磷灰石, 诱导作用, 生物成矿

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 03-0417-06

羟基磷灰石 (Hydroxyapatite, 简称 HAP) 作为人体和动物骨骼、牙齿的主要无机成分^[1], 在骨骼中约占 72%, 在牙齿中则高达 97%, 其生物相容性及活性良好, 对人体无毒副作用。HAP 理论密度为 3.156 g/cm^3 , 莫氏硬度为 5, 折射率在 1.64–1.65, 微溶于水, 溶液呈弱碱性 ($\text{pH} = 7–9$), 易溶于酸而难溶于碱; 其钙磷摩尔比为 1.67, 与天然骨接近^[2]。人工合成的 HAP 具无毒、安全、良好的生物活性和生物相容性特点, 能与人体骨组织形成化学键结合, 产生骨传导作用^[3]; 人体内植入合成 HAP 会在体液作用下发生部分降解, 使钙和磷释放并被组织吸收、利用^[4], 这使得人工合成 HAP 作为硬组织的修复体或置换材料被广泛应用于牙科领域和整形外科^[5]。

此外, Sun 等^[6]将纳米 HAP 微晶用作药物载体, 对其吸附和释放药物的性能进行了研究; 冯凌云等^[7]和张士成等^[8]细胞培养实验发现, 纳米 HAP 微晶对正常细胞活性没有负面作用, 但对癌细胞的生长具有遏制作用。因此, 研究 HAP 及纳米级 HAP 的合成具有重要意义。

国内外制备 HAP 的方法有固相反应法^[9]、化学共沉淀法^[10–11]、溶胶–凝胶法^[12]、水热反应法^[13–14]和微乳液法^[15]等, 归纳起来大致可分为固相合成和液相合成。固相合成需在高温水蒸气参与条件下, 磷酸盐与石灰或石灰石进行固相反应, 其反应时间长, 实用性差; 液相合成法研究比较广泛, 较适合实验室合成和工业生产, 其中水热合成法制备

基金项目: 国家自然科学基金委创优群体项目 (40721002); 中国科学院百人计划项目

* 通信作者。E-mail: bin2368@vip.163.com

作者简介: 何飞 (1986–), 女, 贵州平坝人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物方面的研究。

收稿日期: 2010-10-17; **修回日期:** 2010-12-12

的 HAP 结晶度好,但是需在高压容器中,先用热水将磷酸氢钙水解,设备投资大,不适宜工业化生产;汪港等^[16]以生物原料(牡蛎壳)为来源,应用水热离子交换法合成 HAP,所得 HAP 不仅具有良好的生物活性,而且还保留了生物原始的孔隙结构。早在 1974 年,Roy 等^[17]就利用珊瑚骨为生物原材料转化合成 HAP,至今,有关利用生物原材料转化合成 HAP 的大多数研究报导都是以珊瑚^[17]、鲍鱼壳^[18]、海胆^[19]、乌贼骨^[20]等生物骨骼为原料来合成 HAP,其反应条件较为苛刻。由于现有方法制备的 HAP 颗粒活性低,制备工艺复杂且成本高,应用效果较差,难于推广应用^[21]。因此,寻求一种反应条件温和、工艺简单、低成本高活性的 HAP 生物合成工艺就具有实际意义。

Rosling^[22]在研究土壤真菌分解磷灰石的作用时发现,真菌在磷酸三钙(TCP)存在的情况下,菌丝球内有白色粉末沉积,用 XRD 分析收集到的白色粉末确定为 HAP。本文引入黑曲霉(*Aspergillus niger*)来尝试诱导合成 HAP,致力于寻求一种反应条件温和和工艺简单的 HAP 生物合成途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及培养基:黑曲霉由中国科学院地球化学研究所环境生物科学与技术研究中心提供^[23]。生长培养基采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato Dextrose Agar Medium,PDA 培养基),菌株试验生长温度为 28℃。

1.1.2 主要试剂和仪器:试剂 Na₂HPO₄·12H₂O 购自天津市致远化学试剂有限公司;CaCO₃ 购自天津市塘沽邓中化工厂;透射电子显微镜(TEM,JEM-2000FX)由日本电气公司制造;X 射线衍射仪(XRD,D/MAx-2200 型)由日本 Rigaku 公司制造;精密 pH 计(PHS-3C 型)由上海盛磁仪器有限公司生产。

1.2 菌种的培养与制备

黑曲霉菌种接入灭菌的 PDA 固体培养基斜面,置 28℃电热生化恒温箱培养 3 d;取活化的斜面试管培养物 2 环接入 250 mL PDA 液体培养基中,置 28℃、150 r/min 条件下震荡培养 1 d 后形成大小均匀的菌丝球,以此做为后续试验的接种物。

1.3 黑曲霉对人工合成羟基磷灰石的诱导

采用含不同浓度 Na₂HPO₄ 和 CaCO₃ 的 PDA 液体培养基进行培养。该培养基由 CaCO₃ 提供钙源,Na₂HPO₄ 提供磷源。取容量为 250 mL 的三角瓶加

入 100 mL 上述 PDA 液体培养基,按钙磷摩尔比为 1.67 分别加入不同量 Na₂HPO₄ 和 CaCO₃(表 1),灭菌;接种组加入 10 个菌丝球(每个直径约 5 mm),并设置不加黑曲霉的空白对照组。每组设置 2 个平行样,置 28℃、100 r/min 条件下震荡培养 12 d,分别于接种前和第 3、6、9、12 d 取 2 mL 培养液上清液测其 pH 值并观察菌丝球的生长情况。

表 1 培养基中不同含量的 Na₂HPO₄ 和 CaCO₃

Table 1 The different concentration of Na₂HPO₄ and

Sample	CaCO ₃ in the medium	
	Na ₂ HPO ₄ /(g/100 mL)	CaCO ₃ /(g/100 mL)
A1	0.10	0.12
A2	0.50	0.59
A3	1.00	1.18
A4	2.50	2.95
A5	5.00	5.90

1.4 样品处理方法

1.4.1 TEM 观察:实验结束时,即接种培养 12 d 时收集菌丝球,用去离子水冲洗菌丝球表面后用镊子挑开,再用去离子水冲洗菌丝球内部,收集冲洗液中的白色粉末,TEM 观察(加速电压 160 KV,流速 0.6 μA)。

1.4.2 XRD 分析:分别取培养第 6 d 和第 12 d 菌丝球,用去离子水冲洗菌丝球表面后用镊子挑开,再用去离子水冲洗菌丝球内部,收集冲洗液中的白色粉末,60℃干燥过夜。将少量干燥样品放在玛瑙研钵中研磨到过 200 目筛,XRD 分析(CuKα 辐射,石墨单色器滤波管电压 40 kV,管电流 30 mA,扫描速度:3°/min)。

2 结果和讨论

2.1 沉淀物的 TEM 和 EDS 分析

在样品 A1 - A5 培养液中,A1 和 A2 培养液中的菌丝球内白色粉末太少,无法收集到足量的供后续分析用的沉淀物;A4 培养液中的菌丝球较小,菌丝球包裹的沉淀物太少;而黑曲霉在 A5 培养液中几乎不长;只在 A3 培养液中的菌丝球内能收集到足够后续分析用的沉淀物,故而仅对 A3 培养液中的实验组和空白对照组进行沉淀物的 TEM 分析,结果见图 1。该结果表明在黑曲霉作用下有磷灰石晶体生成(仅凭 TEM 分析尚无法区分磷灰石与 HAP),而不加黑曲霉的空白对照组则没有磷灰石晶体生成。

如图 1 所示,图 1-A 有磷酸钙晶体生成,呈针

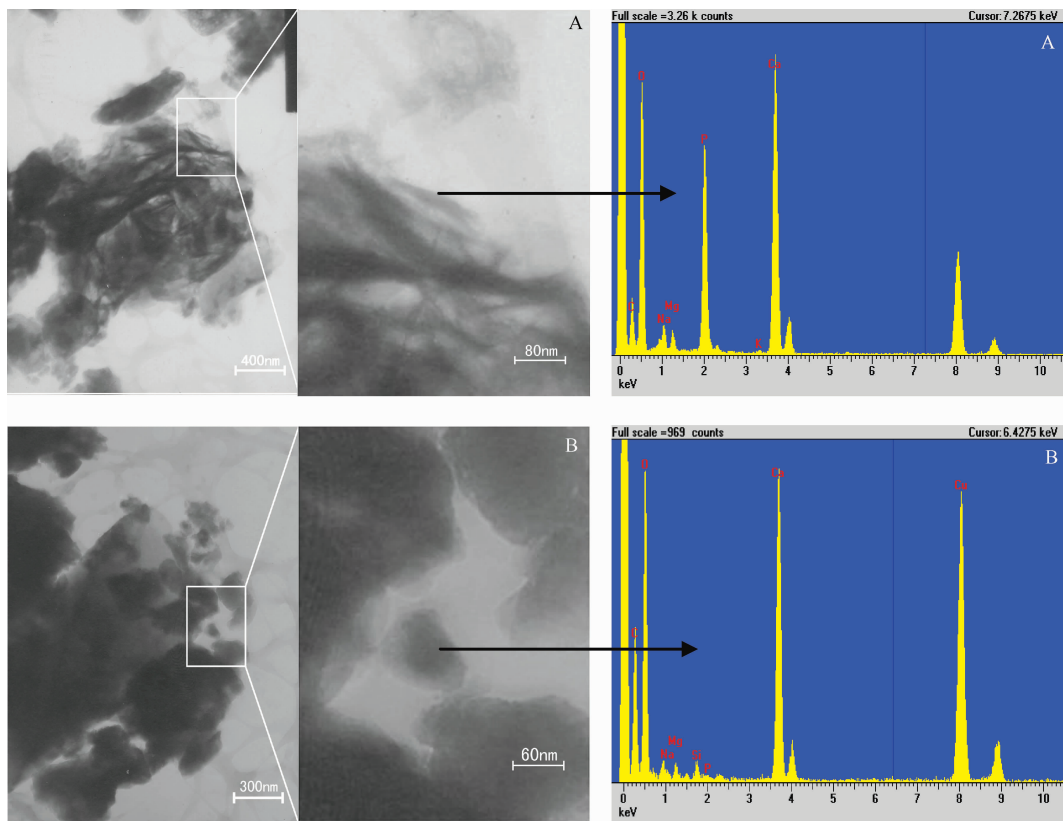


图1 A3培养基中沉淀物的TEM及相应的EDS图谱(A.实验组;B.对照组)

Fig. 1 TEM and EDS images of different samples from A3 medium. A: experimental group; B: control group.

状,直径约40 nm,长约160 nm;图1-B只有微细粒的方解石颗粒,并没有磷酸钙晶体的形成;而相应的EDS图谱分析结果也说明这2种矿物在化学组成上的显著差异。说明在含有合适浓度的 Na_2HPO_4 和 CaCO_3 PDA液体培养基中,接入黑曲霉可以诱导磷灰石晶体的合成。分析其原因,应该是黑曲霉的生长造成培养基pH值降低,导致碳酸钙矿物溶解、钙离子富集并导致后续磷酸盐矿物的形成。由于所分析的沉淀物均取自菌丝球内部,因此有理由认为真菌菌丝生长所形成的菌丝球可能是磷酸盐矿物生物诱导合成的有利场所。

2.2 沉淀物的XRD分析

为进一步确定所形成磷酸钙晶体的矿物组成,对从A3培养液中的菌丝球内收集的沉淀物样品进行XRD分析,结果见图2。

图2-A表明,接入黑曲霉作用12 d时出现了HAP(JCPDS 9-432)的特征衍射峰,其 $d_{(hkl)} = 0.2808 \text{ nm}$;图2-B表明,黑曲霉作用6 d只出现了白磷钙石(JCPDS 9-169)的特征衍射峰, $d_{(hkl)} = 0.2875 \text{ nm}$,该体系存在非结晶的磷、钙,而没有结晶

态磷灰石生成;图2-C中衍射峰与JCPDS 5-586完全相符,为所加入的化学试剂碳酸钙的特征衍射峰, $d_{(hkl)} = 0.3031 \text{ nm}$,还有部分磷酸氢二钠的衍射峰;图2-A和图2-C的结果说明在含有 Na_2HPO_4 和 CaCO_3 的PDA液体培养基中,接入黑曲霉可以诱导HAP合成。此外,比较图2-A和图2-B的结果,可以推测黑曲霉对磷灰石的诱导合成与反应时间有关,反应时间越长,越有利于体系中非结晶态的磷和钙向结晶态转化,并最终生成羟基磷灰石。

2.3 羟基磷灰石形成机理初探

分别于接种前和接种第3、6、9、12 d时取2 mL培养上清液测定pH值,结果见图3。

图3中除对照组0A3和实验组A5,其余实验组培养液pH值都是先降低,再升高,最后又有所下降。出现上述酸性变化规律与黑曲霉的生长状况有关。综合已有的资料^[24-25]以及本实验室研究结果,黑曲霉生长过程中,0-8 h为孢子萌发期,产酸较慢;24 h以后就进入对数生长期,产酸持续增加;大约在第5天之后产酸降低,然后略有回升。图3结果表明,该真菌在第5天前处于快速生长阶段,代谢

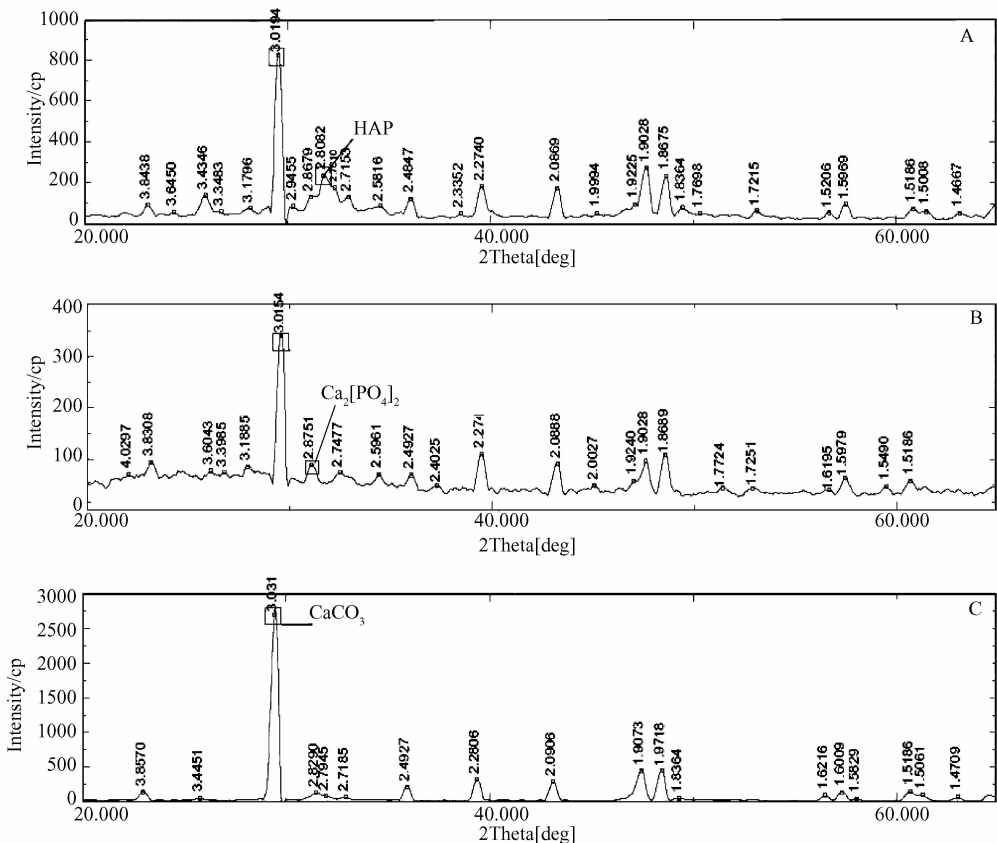


图 2 A3 培养液中沉淀物的 XRD 图谱 (A:黑曲霉作用 12 d;B:黑曲霉作用 6 d;C:未接入黑曲霉)

Fig. 2 Under the conditions of A3, XRD pattern of the samples precipitated under different conditions. A: Culture with *A. niger* for 12 d; B: Culture with *A. niger* for 6 d; C: Control culture with no fungi for 12 d.

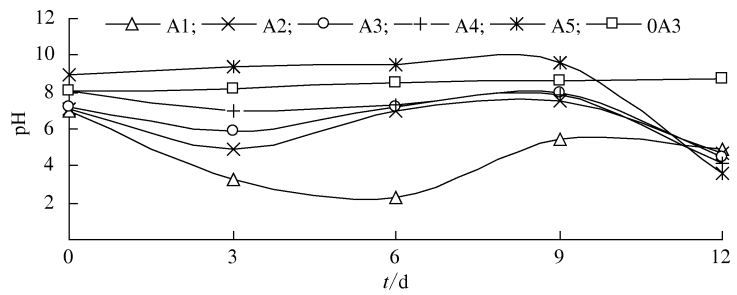


图 3 培养液 pH 值随时间的变化曲线 (0A3 对照组, A1 – A5 为实验组)

Fig. 3 The changing curves of pH with time. 0A3, control group; A1-A5, the experimental group.

产酸导致培养液 pH 值很快降低。培养至第 5 天左右进入稳定生长阶段,代谢产酸相对较少,并且有可能存在次生代谢,将前期代谢产生的有机酸作为次生代谢物被消耗,所以培养液 pH 值开始有所回升。当培养至第 8 天时,该菌生长进入衰亡期,部分菌种开始自溶,导致培养液 pH 值又有所下降。至于对照组,其培养液 pH 值均无上述变化,说明培养液 pH 值的变化是因接入黑曲霉所致;另外,由于实验

组 A5 中加入试剂 Na_2HPO_4 和 CaCO_3 的浓度过高,不利于黑曲霉生长,所以 pH 值也没有出现上述变化。

从化学合成羟基磷灰石的角度来看,碱性环境比较适合羟基磷灰石的形成^[26],因此本实验条件下羟基磷灰石的生成应该就发生在培养后期 pH 值升高的那一段时间,在已有的相关报道中磷灰石的形成往往发生在第 6 天以后^[22]。这也说明羟基磷灰

石的形成与黑曲霉的生长及环境 pH 值的变化密切相关。由于羟基磷灰石的形成会消耗一部分 OH^- (可能来自于水分子或有机物),这也会导致培养液 pH 值再次下降。

黑曲霉在旋转发酵条件下将碳酸钙颗粒包裹在菌丝球内,下降的培养液 pH 值有利于碳酸钙矿物的溶解,释放的钙离子一部分被菌丝吸收利用,一部分可在菌丝体表面富集,并与磷酸根以及羟基结合,导致系列磷酸盐矿物的形成。由于 HAP 在水中的溶解度(0.00004)远远小于 CaCO_3 在水中的溶解度(0.0013),因此,诱导形成的 HAP 在培养液中更为稳定。

Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 和 OH^- 在黑曲霉帮助下反应生成 HAP 的总反应式可表示如下:



3 结论

(1)在含有合适浓度的 Na_2HPO_4 和 CaCO_3 的 PDA 液体培养基中,接入黑曲霉可以促进 HAP 晶体的合成。

(2)黑曲霉对 HAP 合成的诱导作用跟反应时间的长短有关。反应时间长,有利于体系中非结晶态磷、钙向结晶态转化,并最终生成 HAP。

由于黑曲霉诱导合成 HAP 的反应条件温和,制备工艺简单,成本低,因此具有潜在应用前景。

参考文献

- [1] 李世普. 生物医用材料导论. 武汉:武汉工业大学出版社,2000:88-123.
- [2] 李俊杰,姚晖,陈亦平,柏金根,马军阳,姚康德. 微纳米羟基磷灰石及其复合材料研究进展. 化工进展 (Chemical Industry and Engineering Progress), 2006, 25 (6):651-657.
- [3] Suchanek W, Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *Journal of Materials Research*, 1998, 13(1):94-117
- [4] 李蔚,高谦. 纳米羟基磷灰石粉体的制备和低温烧结. 过程工程学报 (The Chinese Journal of Process Engineering), 2002, 2(4):305-308.
- [5] Hench LL. Bioceramic: from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, 1991, 74(7):1487-1510.
- [6] Sun J, Xue M, Kikuchi M, Akao M, Aoki H. Effects of Sr-hydroxyapatite microcrystal on cultured cell. *Biomedical Materials Engineering*, 1994, 4(7):503-12.
- [7] 冯凌云,阎玉华,陈闻杰,李世普,夏清华. 羟基磷灰石溶胶对 W-256 癌肉瘤细胞内钙离子浓度及细胞形态结构的影响. 中国生物医学工程学报 (Chinese Journal of Biomedical Engineering), 1998, 17(4):374-377.
- [8] 张士成,李世普,陈芳. 磷灰石超微粉对癌细胞作用的初步研究. 武汉工业大学学报 (Journal Of Wuhan University Of Technology), 1996, 18(1):5-8.
- [9] Ota Y, Iwashita T, Kasuga T, Abe Y. Novel preparation method of hydroxyapatite fibers. *Journal of American Ceramic Society*, 1998, 81(6):1665-1668.
- [10] Saeri MR, Afshar A, Ghorbani M, Ehsani N, Sorrell CC. The wet precipitation process of hydroxyapatite. *Materials Letters*, 2003, 57(24-25):4064-4096.
- [11] Pang YX, Bao X. Influence of temperature, ripening time and calcination on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles. *Journal of the European Ceramic Society*, 2003, 23(10):1697-1704.
- [12] Bayraktar D, Tas AC. Chemical preparation of carbonated calcium hydroxyapatite powders at 37°C in urea-containing synthetic body fluids. *Journal of the European Ceramic Society*, 1999, 19(13-14):2573-2579.
- [13] 王芹,陶杰,汪涛,王美玲. 水热法合成羟基磷灰石晶须的工艺研究. 功能材料 (Journal Of Functional Materials), 2007, 38(增刊):1715-1719.
- [14] 徐光亮,聂软霞,赖振宇. 水热合成羟基磷灰石纳米粉体的研究. 无机材料学报 (Journal of Inorganic Materials), 2002, 17(3):600-604.
- [15] 杨惠芳,肖凤娟,徐华. 反相微乳液合成羟基磷灰石的新方法. 硅酸盐通报 (Bulletin of the Chinese Ceramic Society), 2006, 25(3):29-31.
- [16] 汪港,张伟钢,唐建,严俊,李浩璇,张刚生. 天然多孔材料水热合成羟基磷灰石. 功能材料 (Journal of Functional Materials), 2008, 39(12):2038-2040.
- [17] Roy DM, Linnehan SK. Hydroxyapatite formed from coral-skeletal carbonate by hydrothermal exchange. *Nature*, 1974, 247:220-222.
- [18] Melde BJ and Stein A. Periodic Macroporous Hydroxyapatite-Containing Calcium Phosphates. *Chemistry of Materials*, 2002, 14(8):3326-3331.
- [19] Araiza MA, Gomez-Morales J, Clemente RR, Castano VM. Conversion of the Echinoderm *Mellita eduardobarrosi* Calcite Skeleton into Porous Hydroxyapatite by Treatment with Phosphated Boiling Solutions. *Journal of Materials Synthesis and Processing*, 1999, 7(4):211-219.
- [20] Rocha JHG, Lemos AF, Agathopoulos S, Valerio P, Kannan S, Oktar FN, Ferreira JMF. Scaffolds for bone restoration from cuttlefish. *Bone*, 2005, 37(6):850-857.

- [21] 李正茂,何文,张旭东,赵洪石,闫顺璞,周伟家. 微生物模板法制备纳米羟基磷灰石. 山东轻工业学院学报 (*Journal of Shandong Institute of Light Industry*), 2008,22(3):5-6.
- [22] Rosling A, Suttle KB, Johansson E, Van Hees PAW, Banfield JF. Phosphorous availability influences the dissolution of apatite by soil fungi. *Geobiology*, 2007, 5: 265-280.
- [23] Cao WC, Hao JH, Lian B, Liu CQ, Wu FC. Zeolite and fungi's flocculability on simulated wastewater containing heavy metal ion or phosphorus. *Chinese Journal of Geochemistry*, 2010, 29(2):137-142.
- [24] 刘晓芳,黄晓东,刘晔. 两株溶磷黑曲霉的生长特性及对不同难溶性磷酸盐的溶解作用. 山东农业大学学报 (自然科学版) (*Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition)*), 2005, 36(2): 232-234.
- [25] 李妍,宁正祥. 反丁烯二酸糠醇甲酯对酵母和霉菌的抑制作用研究. 食品研究与开发 (*Food Research and Development*), 2006, 27(5):151-152.
- [26] 王扬,王宇明,李海东. 纳米羟基磷灰石的制备及工艺优化. 长春工业大学学报 (自然科学版) (*Journal of Changchun University of Technology (Natural Science Edition)*), 2009, 30(2):137-141.

Induced synthesis of hydroxyapatite by *Aspergillus niger*

Fei He¹, Bin Lian^{2*}, Shirong Liu³, Guohong Gong³

¹ Key Laboratory of Karst Environment and Geological Hazard Prevention (Guizhou University), Ministry of Education, Guiyang 550003, China

² State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang, 550002, China

³ State Key Laboratory of Ore Deposit Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China

Abstract: [Objective] The research objective is to induce hydroxyapatite (HAP) synthesis by using fungus. [Methods] We used the PDA (Potato Dextrose Agar Medium) liquid medium containing different concentrations of Na₂HPO₄ and CaCO₃ to study the way *Aspergillus niger* synthesize HAP, to observe the induced mineral crystal structure and to analyze the induced mineral type with transmission electron microscopy (TEM) and X-ray diffraction (XRD). [Results] The main results are as follows: (1) *A. niger* can induce HAP synthesis in PDA liquid medium with the proper concentration of Na₂HPO₄ and CaCO₃. (2) The reaction of *A. niger* inducing HAP synthesis depends on the time of the response system. Longer time is more advantageous in producing HAP. The main reason for *A. niger* inducing HAP crystals formation are as follows: fungal metabolism produces the acidic substances to dissolve CaCO₃ and the growth mycelia absorbing Ca²⁺ lead to Ca²⁺ enriched on the surface, to promote the production of secondary mineral apatite and further transform into HAP in the mycelia spheres. [Conclusion] *A. niger* can inducing HAP crystals formation in PDA liquid medium containing Na₂HPO₄ and CaCO₃. Considering the importance of HAP in bio-medicine materials and its costly prices, our method for HAP bio-induction is of the temperate response condition, simple preparation craft, and lower cost, which has the potential application prospect.

Keywords: *Aspergillus niger*, hydroxyapatite, Induction, Biological mineralization

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Science Foundation for Innovative Research Group (40721002) and the Chinese Academy of Sciences' "Hundred Talents" Project.

* Corresponding author. Tel: +86-851-5895148; Fax: +86-851-5895148; E-mail: bin2368@vip.163.com

Received: 17 October 2010/Revised: 12 December 2010