

## بررسی تاثیر درجه اسیدی محلول سوبسترا، دمای گرمخانه‌گذاری و دمای کلسینه کردن بر تولید باکتریایی هیدروکسی آپاتیت نانو ساختار

بابک مستغاثی\*، محمدحسین فتحی\*\*، محمود شیخ زین‌الدین\*\*\* و صبیحه سلیمان‌زاد\*\*\*

دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

(دریافت مقاله: ۸۶/۱۰/۲۴ - دریافت نسخه نهایی: ۸۷/۸/۲۷)

**چکیده** - روش رسوب دهی زیستی از جمله روشهای نوین تولید هیدروکسی آپاتیت نانو ساختار است. در این پژوهش از یک سویه بومی باکتریای *سراسیا* به منظور تولید پودر هیدروکسی آپاتیت نانو ساختار استفاده شد. تولید پودر هیدروکسی آپاتیت در درجه‌های اسیدی (pH) گوناگون محلول سوبسترا و چند دمای مختلف گرمخانه‌گذاری به انجام رسید. پودر هیدروکسی آپاتیت تولید شده پس از انجام عملیات کلسینه کردن در دماهای مختلف، با استفاده از تکنیک‌های مختلف میکروسکوپ الکترونی روبشی و میکروسکوپ الکترونی عبوری، پراش پرتو ایکس و آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه تحت ارزیابی و بررسی‌های گوناگون قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان بیشینه تولید پودر هیدروکسی آپاتیت هنگامی که درجه اسیدی محلول سوبسترا برابر هشت و دمای گرمخانه‌گذاری ۳۷ درجه سانتی‌گراد باشد، صورت گرفته است. همچنین مشاهده شد که با انجام عمل کلسینه کردن در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد، پودر هیدروکسی آپاتیت نانو ذره با بلورینگی مناسبتر و آگلومره شدن کمتر ذرات در مقایسه با روشهای معمول ساخت هیدروکسی آپاتیت نانو ساختار تولید شده است.

واژگان کلیدی: هیدروکسی آپاتیت، رسوب‌دهی زیستی، *سراسیا*، نانوفناوری زیستی

# Effects of Substrate Solution pH, Incubation Temperature, and Calcination Temperature on Bacterial Synthesis of Nano-Crystalline Hydroxyapatite

B. Mostaghaci, M. H. Fathi, M. Sheikh-Zeinoddin, and S. SoleimanianZad

Department of Materials Engineering, Isfahan University of Technology  
Department of Food Science and Engineering, College of Agriculture, Isfahan University of Technology

**Abstract:** *Biom mineralization is among the new methods for the synthesis of nanostructured Hydroxyapatite (nHA). In this study, nanostructured HA was synthesized using an Iranian strain of Serratia. The powder was synthesized at different pH levels of the substrate solution and at different incubation temperatures. Calcination treatment processes were performed at different temperatures. Scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD), and fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) techniques were utilized to characterize the obtained powders. Results showed that maximum powder production occurred at a substrate solution pH level of 8 and an incubation temperature of 37 °C. After calcination treatment at 600 °C, nano-particle HA powder was synthesized. The resulting powder was found to have a higher crystallinity and a lower degree of agglomeration compared to the nanostructured nHA synthesized using conventional methods.*

**Keywords:** *Hydroxyapatite, Biom mineralization, Serratia, Nanobiotechnology.*

## ۱- مقدمه

کاربرد پزشکی گروه سرامیکهای کلسیم فسفات از جمله هیدروکسی آپاتیت، بخش عظیمی از تحقیقات پیرامون تولید بیومواد مورد استفاده در ساخت یا تثبیت زیستی کاشتیهایی مورد استفاده در بدن انسان را در بر می گیرند. این کاربردها به طور عمده به دلیل شباهت ترکیب شیمیایی هیدروکسی آپاتیت به ترکیب شیمیایی استخوان است [۱]. از جمله کاربردهای هیدروکسی آپاتیت پوشش دهی کاشتیهایی مورد استفاده در بدن، بازسازی و خلق دوباره بافت استخوانی، ساخت کاشتیهایی استخوانی و ساخت داربستهای مهندسی بافت استخوان است [۱-۳].

بر خلاف شباهت ترکیب شیمیایی، خواص مکانیکی هیدروکسی آپاتیت مصنوعی در مقایسه با استخوان بسیار ضعیف است. بخش معدنی استخوان همچنین زیست فعالی بالاتری را در مقایسه با هیدروکسی آپاتیت مصنوعی از خود نشان می دهد. پژوهشها نشان داده اند که هیدروکسی آپاتیت نانومتری خواص مطلوبتری در مقایسه با نمونه های میکرونی ارائه می دهد. پودرهای هیدروکسی آپاتیت نانو ساختار قابلیت تف جوشی مناسبتر و چگالی نسبی بالاتری را نشان می دهد [۴] که موجب

بهبود چقرمگی شکست و دیگر خواص مکانیکی آن می شود [۵]. علاوه بر این هیدروکسی آپاتیت نانومتری زیست فعالی بهتری در مقایسه با بیوسرامیکهای درشت دانه ارائه می دهد [۶ و ۷].

خواص هیدروکسی آپاتیت نانو ساختار از جمله اندازه دانه ذرات، سطح تماس، اندازه تخلخل و ترشوندگی می تواند بر همکنش هیدروکسی آپاتیت با پروتئینها (برای مثال جذب و پیکره بندی پروتئین و زیست فعالی) را کنترل کند و در نتیجه به اتصال بیشتر سلولهای استئوبلاست به هیدروکسی آپاتیت نانومتری و در نتیجه عملکرد طولانی مدت کاشتنی منجر شود. پژوهشها نشان داده اند که فعالیت افزایش یافته سلولهای استئوبلاست با تکثیر این سلولها، تولید آنزیم آکالین فسفاتاز و رسوب مواد معدنی حاوی کلسیم همراه است. توپوگرافی دانه های نانومتری هیدروکسی آپاتیت و ترشوندگی سطحی نه تنها جذب انتخابی ویتروکتین (پروتئینی که در اتصال استئوبلاست دخالت دارد) را افزایش می دهد، بلکه سبب ساز افزایش عملکرد و فعالیت سلولهای استئوبلاست نیز می شود [۸-۱۰].

پژوهشهای بسیاری پیرامون انتقال محصولات زیستی و به

خصوصاً ژنها با استفاده از ذرات هیدروکسی آپاتیت نانومتری انجام شده است. نشان داده شده است که هیدروکسی آپاتیت نانومتری می تواند قطعه ژنتیکی را فشرده کرده و به عنوان حاملی مناسب برای انتقال قطعه ژنتیکی به داخل سلول عمل کند. همچنین بارگذاری قطعه ژنتیکی بر روی هیدروکسی آپاتیت نانومتری نسبت به بسیاری از حاملهای دیگر راحت تر است [۱۱ و ۱۲].

در ساخت قطعات کاشتنی در بدن از جنس هیدروکسی آپاتیت نانومتری خواص مکانیکی قطعۀ نهایی هنگامی در سطح بهینه قرار می گیرد که ذرات از اندازه و شکل یکنواخت و میزان پایین آگلومره بودن برخوردار باشند. این پارامترها در کاربرد هیدروکسی آپاتیت به عنوان حامل ماده ژنتیکی نیز بسیار مهم است؛ نشان داده شده است که در فرایند انتقال ژن توسط هیدروکسی آپاتیت نانومتری هنگامی بالاترین بازده قابل حصول است که میزان آگلومره شدن ذرات در پایینترین حد قرار داشته باشد [۱۱ و ۱۳].

تاکنون روشهای گوناگونی برای تولید هیدروکسی آپاتیت نانو ساختار معرفی شده است. روشهای سل-ژل، رسوب الکتروشیمیایی و سنتز مکانیکی- شیمیایی از این جمله اند [۱۴-۱۵]. با این حال در اکثر این روشها ذرات پودر تولید شده از نظر اندازه و شکل یکنواخت نیستند و به علت انرژی سطحی بالای ذرات نانومتری، میزان آگلومره شدن بالای ذرات به وقوع می پیوندد [۱۳].

از جمله روشهای نوین تولید هیدروکسی آپاتیت نانومتری رسوب دهی زیستی است. واژه رسوب دهی زیستی به فرایندهای طبیعی اشاره دارد که طی آنها موجود زنده از مواد آلی و غیر آلی ماده جدیدی را تولید می کند. با کنترل فرایند رسوب دهی زیستی می توان مواد معدنی با ساختار و ترکیب دلخواه به دست آورد [۱۶ و ۱۷]. در پژوهشهای قبلی [۱۳ و ۱۸] از سویه خاصی از باکتری *S. aureus* با قابلیت تولید بالای آنزیم فسفاتاز به منظور تولید هیدروکسی آپاتیت نانومتری استفاده شده است. این پژوهشها نشان دادند که هیدروکسی آپاتیت

تولیدی دارای ذراتی با اندازه و شکل یکنواخت و میزان پایین آگلومره شدن است [۱۸].

با توجه به مزایای قابل توجه هیدروکسی آپاتیت تولید شده توسط روش باکتریایی، در این پژوهش تولید پودر هیدروکسی آپاتیت نانو ساختار با استفاده از یک سویه بومی باکتری *S. aureus* مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه تاثیر درجه اسیدی (pH) محلول سوستر، دمای گرمخانه گذاری و دمای عملیات کلسینه کردن بر میزان تولید، بلورینگی و اندازه دانه پودر تولیدی بررسی شد.

## ۲- روش آزمون

### ۲-۱- تهیه و کشت باکتری

باکتری مورد استفاده در این آزمون (باکتری *S. aureus* مارسنس سویه PTCC 1187) از مرکز کلکسیون قارچها و باکتریهای ایران تهیه شد. این باکتری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و در محیط کشت آبگوشت مغذی (مرک، آلمان) مورد کشت قرار گرفت.

### ۲-۲- آزمون فعالیت آنزیم فسفاتاز

به منظور بررسی قابلیت تولید آنزیم فسفاتاز در این باکتری از روش مورد استفاده توسط پمپی و همکارانش [۱۹ و ۲۰] همراه با تغییرات جزئی در نحوه انجام آزمون استفاده شد. فعالیت آنزیم آزاد شده در محیط کشت و آنزیم متصل به دیواره سلولی در دو درجه اسیدی ۶ و ۸ به صورت مجزا مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از سوسترای پارا- نیتروفنیل فسفات (سیگما، آمریکا) استفاده شد. پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد جذب نوری نمونه ها در طول موج ۴۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد و اندیس فعالیت آنزیم فسفاتاز از تقسیم جذب نوری نمونه بر تعداد باکتریها محاسبه شد. کلیه آزمونها در سه تکرار انجام شد. شمارش باکتریها در هر آزمون توسط روش شمارش کلونهای تشکیل شده بر روی صفحه ۱ با تهیه رقتهای مناسب از محلول

حاوی باکتری و کشت آنها بر روی محیط کشت آگار مغزی (مرک، آلمان) به روش کشت سطحی انجام شد.

## ۲-۳- تولید رسوب

### ۲-۳-۱- آماده سازی محلول سوبسترا

برای تهیه محلول مورد استفاده به منظور تولید هیدروکسی آپاتیت ۱۰ میلی مول کلرید کلسیم ( $\text{CaCl}_2$ ) (مرک، آلمان) به همراه ۲۰ میلی مول تری-سدیم سیترات (مرک، آلمان) و ۲۵ میلی مول گلیسرول ۲-فسفات (G2P) (مرک، آلمان) در محلول ۲۵ میلی مولار بافر تریس (مرک، آلمان) حل شد. سپس این محلول توسط اتوکلاو استریل شد.

### ۲-۳-۲- تهیه و شستشوی توده باکتریایی

باکتری *Srashiia marssonis* سویه PTCC 1187 در محیط کشت آبگوشت مغزی (مرک، آلمان) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و تحت هوادهی با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت یک شب کشت داده شد. سپس به ازای هر یک لیتر محلول سوبسترا یک لیتر محیط کشت آبگوشت مغزی استریل آماده شد. از سوسپانسیون باکتریایی رشد یافته آن‌قدر به آبگوشت مغزی استریل افزوده شد تا جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر ( $\text{OD}_{600}$ ) نسبت به نمونه شاهد (آبگوشت مغزی استریل) به ۰/۰۵ برسد. مخلوط حاصل در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و تحت هوادهی با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت یک شب گرمخانه گذاری شد. توده باکتریایی توسط دستگاه سانتریفیوژ جدا شد و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی با محلول سوبسترا مخلوط شد.

### ۲-۳-۳- مخلوط کردن توده باکتریایی با محلول سوبسترا

توده باکتریایی با محلول سوبسترا به خوبی مخلوط شد. سپس محلول سوبسترا به مقادیر ۷، ۷/۵، ۸، ۸/۵ و ۹ تنظیم شد. درجه اسیدی هر قسمت توسط اسید کلریدریک (مرک، آلمان) استریل بر روی مقادیر ۷، ۷/۵، ۸، ۸/۵ و ۹ تنظیم شد.

سوسپانسیون حاصل در دماهای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت چهارده روز همراه با هوادهی با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری شد.

### ۲-۳-۴- جمع‌آوری رسوب حاصل

رسوب حاصل پس از چهارده روز توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱ (واتمن، انگلیس) جمع‌آوری شد. کاغذ صافی حاوی رسوب در هوا خشک شد. میزان رسوب حاصل پس از انجام آزمون در شرایط گوناگون در سه تکرار اندازه‌گیری شد.

### ۲-۳-۵- کلسینه کردن پودر تولیدی

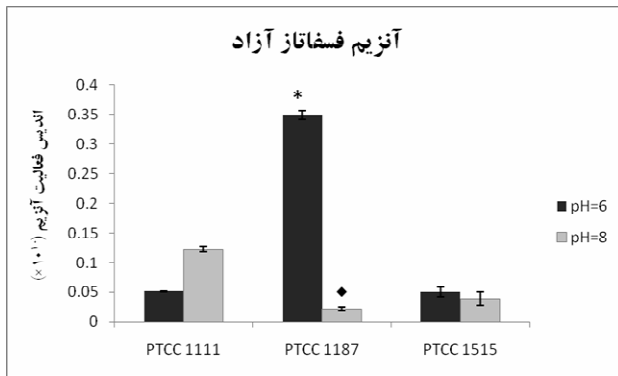
به‌منظور حصول بلورینگی مناسب فاز هیدروکسی آپاتیت در پودر تولیدی رسوب خشک شده در دماهای ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد تحت عملیات کلسینه کردن قرار گرفت.

### ۲-۴- مشخصه یابی پودر تولیدی

پودر کلسینه شده و کلسینه نشده با تکنیکهای پراش پرتو ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه (FTIR) مورد بررسی و مشخصه‌یابی قرار گرفت. اندازه‌دانه‌ها بر اساس الگوی پراش پرتو ایکس توسط روش ویلیامسون-هال محاسبه و تعیین شد. به‌منظور تعیین بلورینگی پودر کلسینه شده نیز از روش معرفی شده توسط پانگ و بائو [۲۱] استفاده شد.

### ۲-۵- تحلیل آماری

تحلیل‌های آماری به کمک نرم افزار تحلیل آماری SPSS، نسخه ۱۱ (شرکت SPSS، آمریکا) انجام شد. داده‌های حاصل از انجام آزمونهای بررسی فعالیت آنزیم و اندازه‌گیری میزان رسوب توسط روش تحلیل یک طرفه واریانس (One-way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت. تفاوتها



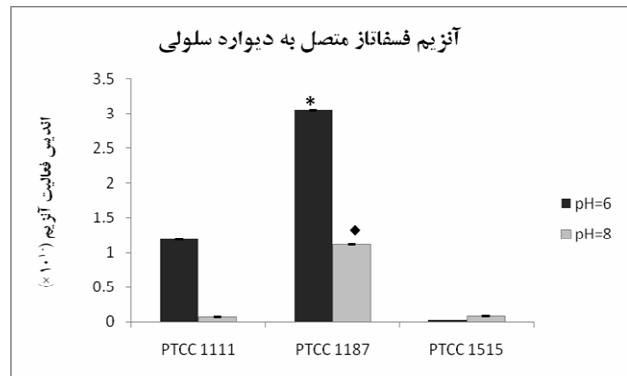
شکل ۲- اندیس فعالیت آنزیم آزاد در دو درجه اسیدی شش و هشت برای سویه‌های بومی باکتری *سراشیا*. برای باکتری *سراشیا* مارسسنس PTCC 1187 در هر دو درجه اسیدی شش (×) و هشت (♦) تفاوت معنی دار مشاهده شد ( $p < 0.05$ ).

سلولی صورت می‌پذیرد [۱۵]. وجود مقدار زیاد آنزیم آزاد شده در محیط کشت می‌تواند سبب شود که هیدروکسی آپاتیت میکرومتری آگلومره شده در محیط کشت تولید شود. به دلیل بالاتر بودن معنادار آنزیم فسفاتاز متصل به دیواره سلولی و پایتتر بودن معنادار آنزیم آزاد سویه باکتریایی *سراشیا* مارسسنس PTCC 1187 نسبت به دو سویه دیگر در درجه اسیدی برابر هشت، این سویه به منظور تولید باکتریایی هیدروکسی آپاتیت نانومتری انتخاب شد.

### ۳-۲- بررسی میزان تولید رسوب

از آنجا که فعالیت آنزیم فسفاتاز آزاد سویه باکتریایی *سراشیا* مارسسنس PTCC 1187 در درجه اسیدی برابر شش نسبت به دو سویه دیگر بالاتر و در درجه اسیدی برابر هشت نسبت به دو سویه دیگر پایتتر است، گستره درجه اسیدی بالاتر از هفت برای مطالعه تولید پودر هیدروکسی آپاتیت انتخاب شد.

در شکل‌های (۳) و (۴) میزان تولید رسوب در درجه‌های اسیدی گوناگون و دماهای گرمخانه گذاری برابر ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد با یکدیگر مقایسه شده است. در دمای گرمخانه گذاری برابر ۳۰ درجه سانتی‌گراد، شکل (۳)، میزان تولید رسوب در درجه اسیدی برابر هشت به طور معناداری بالاتر از میزان رسوب در سایر درجه‌های اسیدی است ( $p < 0.05$ ). در دمای



شکل ۱- اندیس فعالیت آنزیم متصل به دیواره سلولی در دو درجه اسیدی شش و هشت برای سویه‌های بومی باکتری *سراشیا*. برای باکتری *سراشیا* مارسسنس PTCC 1187 در هر دو درجه اسیدی شش (×) و هشت (♦) تفاوت معنی دار مشاهده شد ( $p < 0.05$ ).

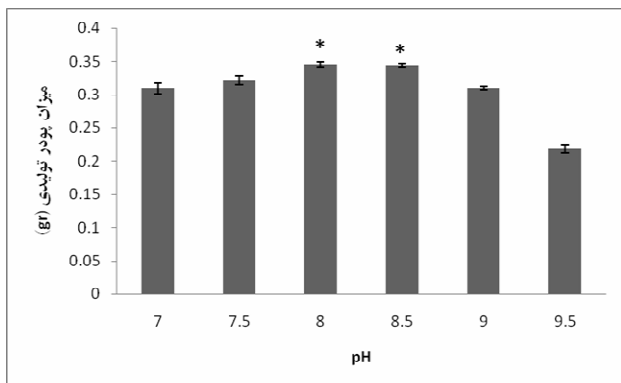
هنگامی معنی دار محسوب شد که مقدار  $p$  کوچکتر از ۰٫۰۵ به دست آمد.

### ۳- نتایج و بحث

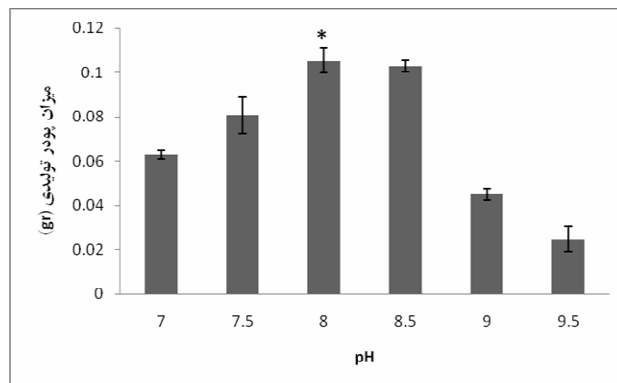
#### ۳-۱- بررسی فعالیت آنزیم باکتری

نتایج مربوط به اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فسفاتاز متصل به دیواره سلولی سویه‌های بومی باکتری *سراشیا* در شکل (۱) نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که تمامی این سویه‌های باکتریایی از فعالیت آنزیم فسفاتاز برخوردارند. این نتیجه با پژوهش ساتا و همکارانش که نشان دادند بر خورداری از فعالیت آنزیم فسفاتاز خاصیت غالب باکتریهای عضو خانواده انتروباکتریاسه (از جمله *سراشیا*) است در تطابق است [۲۲].

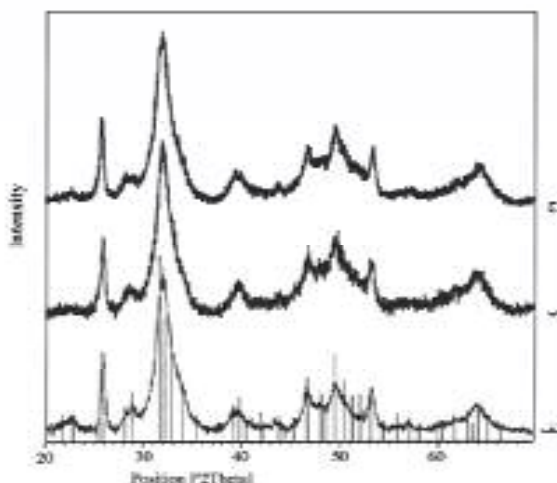
همان‌گونه که در شکل (۱) مشاهده می‌شود فعالیت آنزیم متصل به دیواره سلولی در باکتری *سراشیا* مارسسنس سویه PTCC 1187 در هر دو درجه اسیدی شش و هشت به طور معناداری بالاتر از فعالیت آنزیم دو سویه باکتریایی دیگر است ( $p < 0.05$ ). از طرف دیگر، همان‌گونه که در شکل (۲) مشخص است فعالیت آنزیم آزاد این سویه باکتریایی در درجه اسیدی هشت به طور معناداری کمتر از فعالیت آنزیم دو سویه دیگر است ( $p < 0.05$ ). تولید هیدروکسی آپاتیت به صورت نانوساختار تنها بر روی دیواره سلولی باکتری و در شبکه پلی‌میری خارج



شکل ۴- تاثیر درجه اسیدی محلول سوبسترا بر میزان تولید رسوب در دمای گرمخانه گذاری برابر با ۳۷ درجه سانتی گراد. در درجه‌های اسیدی برابر با ۸ و ۸٫۵ میزان تولید رسوب نسبت به سایر درجه‌های اسیدی به طور معناداری بالاتر است ( $p < 0.05$ ).



شکل ۳- تاثیر درجه اسیدی محلول سوبسترا بر میزان تولید رسوب در دمای گرمخانه گذاری برابر با ۳۰ درجه سانتی گراد. در درجه اسیدی برابر با هشت میزان تولید رسوب نسبت به سایر درجه‌های اسیدی به طور معناداری بالاتر است ( $p < 0.05$ ).



شکل ۵ - مقایسه میان الگوی پراش پودر تولید شده در پژوهش قبلی [۱۳] (الف) با پودر تولید شده در محلول سوبسترا با درجه اسیدی برابر هشت و گرمخانه گذاری شده در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد (ب) و پودر تولید شده در محلول سوبسترا با درجه اسیدی برابر هشت و گرمخانه گذاری شده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد (ج).

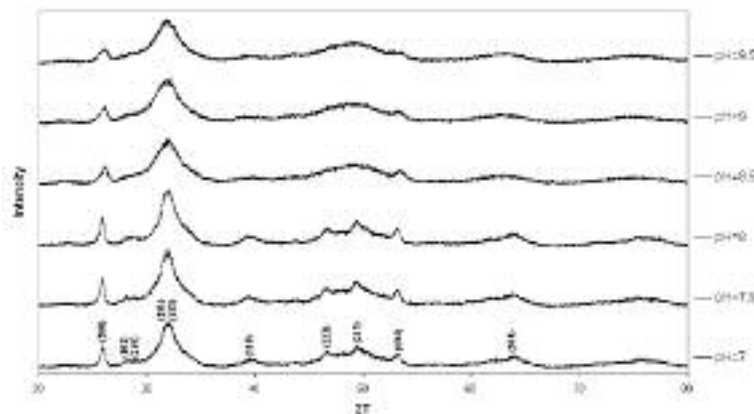
بالاتر از میزان تولید پودر در دمای گرمخانه گذاری برابر با ۳۰ درجه سانتی گراد است.

### ۳-۳-۳- مشخصه‌یابی با تکنیک پراش پرتو ایکس

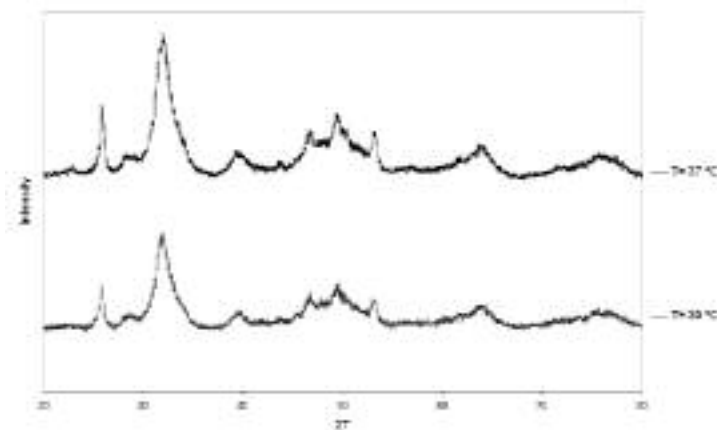
#### ۳-۳-۱- بررسی‌های ساختاری

شکل (۵) الگوی پراش پرتو ایکس نمونه‌های تولید شده در این پژوهش (دماهای انکوباتورگذاری برابر ۳۰ و ۳۷ درجه

گرمخانه گذاری برابر ۳۷ درجه سانتی گراد شکل (۴) میزان پودر تولیدی در درجه‌های اسیدی ۸ و ۸٫۵ به طور معناداری بالاتر از میزان پودر تولیدی در سایر درجه‌های اسیدی است ( $p < 0.05$ )؛ با این حال میزان پودر تولیدی در این دو درجه اسیدی با یکدیگر تفاوت معناداری ندارد. نکته مهم این است که در دمای گرمخانه گذاری برابر با ۳۷ درجه سانتی گراد میزان تولیدی پودر در کلیه درجه‌های اسیدی به طور چشمگیری



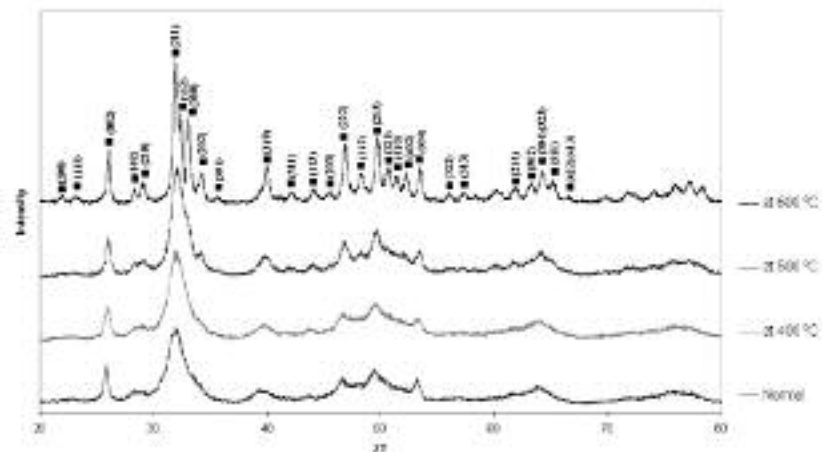
شکل ۶- مقایسه الگوی پراش پرتو ایکس نمونه‌های تولید شده در محلول سوبسترا با درجه‌های اسیدی مختلف و گرمخانه گذاری شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.



شکل ۷- مقایسه الگوی پراش پرتو ایکس نمونه‌های تولید شده در محلول سوبسترا با درجه‌های اسیدی برابر هشت و گرمخانه گذاری شده در دماهای گوناگون.

شده با روشهای دیگر به بلورینگی مورد نظر دست یابد.. شکل (۶) تاثیر درجه اسیدی محلول سوبسترا را بر الگوهای پراش پرتو ایکس پودر تولیدی در دمای گرمخانه‌گذاری برابر ۳۷ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود در این حالت در تمام درجه‌های اسیدی پیکهای فاز هیدروکسی‌آپاتیت ظاهر شده‌اند. با این حال حداکثر تیزی و شدت پیکها در درجه‌های اسیدی ۸ و ۸/۵ رخ می‌دهد. این امر احتمالاً به دلیل فعالیت بالاتر آنزیم فسفاتاز در این درجه‌های اسیدی نسبت به درجه‌های اسیدی دیگر است. در شکل (۷) الگوهای پراش پرتو ایکس ماده تولیدی در دماهای گرمخانه‌گذاری ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد مقایسه

سانتی‌گراد، طیفهای ب و ج) و مقایسه آنها با الگوی پراش پرتو ایکس نمونه تولید شده در پژوهش سامونز و همکارانش (طیف الف) [۱۳] قبل از انجام عمل کلسینه کردن را نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود که الگوهای پراش تطابق بسیار خوبی با یکدیگر نشان می‌دهند و پیکهای مربوط به فاز هیدروکسی‌آپاتیت در هر سه الگوی پراش از نظر زوایا و شدت نسبی پیکها به طور مطلوبی با یکدیگر مطابقت دارند. با این حال رسوب تولیدی (طیفهای ب و ج) از بلورینگی کافی برخوردار نیست. بلوری شدن ساختار قبل از عمل کلسینه‌کردن از خواص جالب توجه روش تولید باکتریایی است که می‌تواند سبب شود تا پودر تولیدی در دمای کلسینه کردن کمتری نسبت به پودرهای تولید



شکل ۸- مقایسه میان نمونه کلسینه نشده و نمونه‌های کلسینه شده در دماهای ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد. درجه اسیدی محلول سوبسترا برابر هشت و دمای گرمخانه گذاری ۳۷ درجه سانتی‌گراد است.

جدول ۱- مشخصات پیکهای مورد استفاده برای تعیین میزان بلوری شدن نمونه‌های کلسینه شده در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد.

درصد بلوری شدن	$V_{112/300}$	$I_{300}$	دمای گرمخانه‌گذاری
۷۸	۳۴۷,۳۲۰	۱۵۸۲,۵۱۰	درجه سانتی‌گراد
۶۸,۶	۳۶۹,۹۲۰	۱۱۷۸,۸۲۰	درجه سانتی‌گراد

تمامی پیکهای مشخصه موجود در الگوی پراش هیدروکسی‌آپاتیت استاندارد [۲۳] در الگوی پراش نمونه کلسینه شده ظاهر شده‌اند. ضمن اینکه هیچ پیک مشخصه دیگری مربوط به سایر فازها نظیر تری-کلسیم فسفات و اکسید کلسیم مشاهده نمی‌شود. بر اساس استاندارد انجمن مواد و آزمون آمریکا (ASTM) استاندارد شماره F1185-88-1990 [۲۴] ترکیب شیمیایی قابل قبول برای هیدروکسی‌آپاتیت تجارتي حداقل ۹۵ درصد هیدروکسی‌آپاتیت است که توسط تکنیک پراش پرتو ایکس تعیین می‌شود. بنابراین نمونه‌های کلسینه شده در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد بر اساس استاندارد انجمن مواد و آزمون آمریکا هیدروکسی‌آپاتیت بلوری محسوب می‌شوند.

### ۳-۲- تعیین بلورینگی

برای اندازه‌گیری میزان بلوری شدن فاز هیدروکسی‌آپاتیت از رابطه (۱) استفاده شد. جدول (۱) مشخصات پیکهای مورد استفاده در تعیین میزان بلوری شدن و میزان بلوری شدن نمونه‌های تولید

شده‌اند. همان‌گونه مشاهده می‌شود بیشینه شدت پیکها و تفکیک آنها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رخ داده است. این امر را می‌توان به شرایط بهتر رشد باکتری و فعالیت بالاتر آنزیم فسفاتاز در این دما نسبت به سایر دماها مربوط دانست. سرعت بالاتر رشد باکتری سبب می‌شود که همواره تشکیل رسوب بر روی غشا باکتریها و به صورت بلوری صورت گیرد. به نظر می‌آید که این مسئله به این دلیل است که با زیاد شدن تعداد باکتریها رسوب کلسیم فسفات فرصت تشکیل در محلول را به واسطه آنزیم فسفاتاز رها شده در محیط کشت پیدا نخواهد کرد.

شکل (۸) تاثیر عملیات کلسینه کردن را بر الگوی پراش پرتو ایکس پودر تولید شده در درجه اسیدی محلول سوبسترا برابر هشت و گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود که در دماهای کلسینه کردن کمتر از ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد تغییر چندانی در الگوهای پراش ظاهر نشده و تنها برخی پیکها مقداری تیزتر و تفکیک شده‌تر شده‌اند. در دمای کلسینه کردن ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد



شده در محلول سوبسترا با درجه اسیدی برابر هشت، گرمخانه‌گذاری شده در دماهای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و کلسینه شده در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد.

$$Xc = 1 - (V_{112/300} / I_{300}) \quad (1)$$

که در آن  $Xc$  میزان بلوری شدن،  $I_{300}$  شدت پیک تفرق (۳۰۰) و  $V_{112/300}$  شدت حفره بین پیکهای تفرق (۱۱۲) و (۳۰۰) هیدروکسی آپاتیت است.

هیدروکسی آپاتیت زیستی دارای ابعاد نانومتری بوده و میزان بلوری شدن آن نیز ۶۰ تا ۷۰ درصد است و به همین علت خواص زیست‌اضمحلالی ویژه‌ای از خود نشان می‌دهد [۲۵]. مشاهده شد که در این پژوهش بلورینگی پودر تولیدی پس از تف‌جوشی برای هر دو نمونه گرمخانه‌گذاری شده در دماهای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محدوده بلورینگی هیدروکسی آپاتیت زیستی قرار دارد.

همچنین مشاهده می‌شود که نمونه تولید شده در دمای گرمخانه‌گذاری ۳۰ درجه سانتی‌گراد درصد بلوری شدن بالاتری را پس از تف‌جوشی در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد. این امر می‌تواند به علت اندازه دانه کوچکتر و شکل و اندازه یکنواخت‌تر ذرات باشد که سبب می‌شود تا بلوری شدن به‌صورت یکنواخت‌تر و در دمای پایبتری صورت گیرد.

### ۳-۳-۳- تعیین اندازه دانه

اندازه دانه پودر تولیدی در محلول سوبسترا با درجه اسیدی برابر هشت و دماهای گرمخانه‌گذاری گوناگون پس از انجام عمل کلسینه کردن در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از روش ویلیامسون-هال ۲۵ تا ۲۹ نانومتر به دست آمد. این امر حاکی از این مسئله است که اندازه‌دانه‌های هیدروکسی آپاتیت تولید شده به روش باکتریایی در گستره اندازه‌دانه هیدروکسی آپاتیت زیستی (۲۵ تا ۵۰ نانومتر) است [۱].

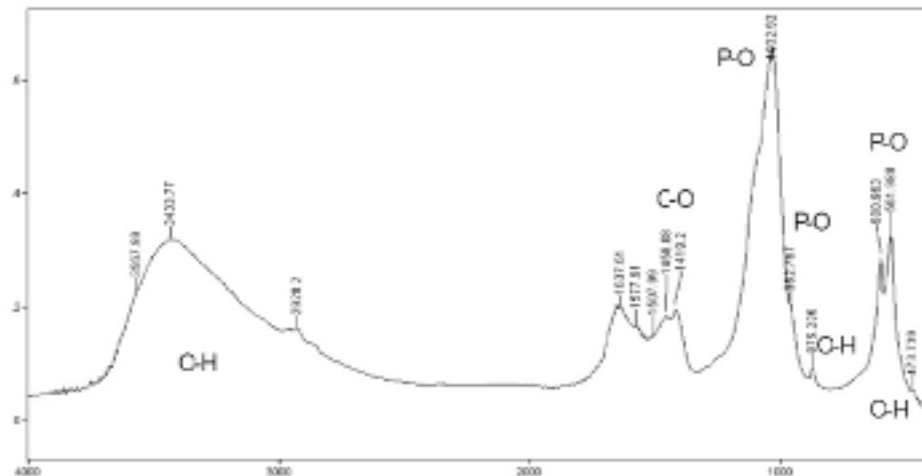
### ۳-۴- آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه

شکلهای (۹) و (۱۰) طیفهای مادون قرمز با تبدیل فوریه

نمونه تولید شده در محلول سوبسترا با درجه اسیدی برابر هشت، گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کلسینه نشده و کلسینه شده در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد. همچنین در جدول (۲) پیکهای شاخص مربوط به الگوی طیف مادون قرمز با تبدیل نمونه نمونه هیدروکسی آپاتیت استاندارد [۲۶ و ۲۷] و نمونه‌های کلسینه نشده و کلسینه شده حاصل از این پژوهش درج شده است.

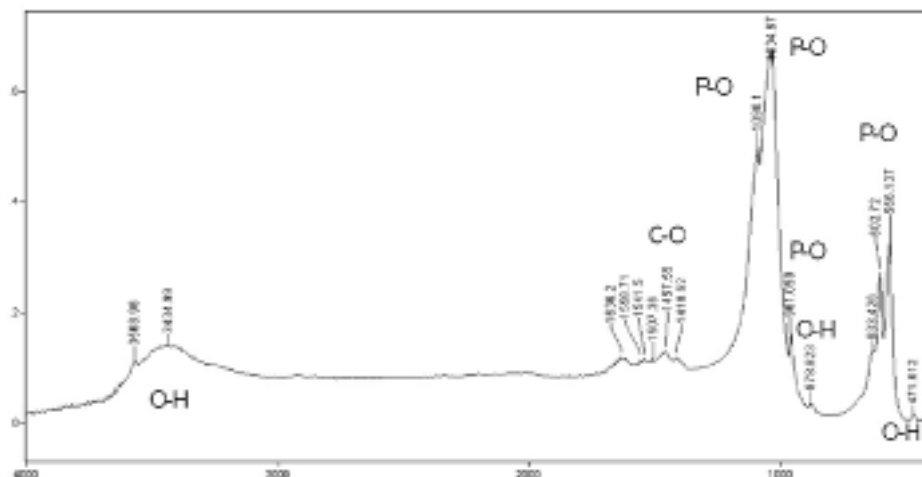
همان‌گونه که در تصاویر طیفهای مادون قرمز و همچنین جدول (۲) مشخص است در طیف مادون قرمز هر دو نمونه‌ها پیکهای شاخص هیدروکسی آپاتیت مثل پیکهای  $\text{OH}^-$  ( $\text{cm}^{-1}$  ۳۵۷۰ و ۶۳۴) و پیکهای  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\text{cm}^{-1}$  ۵۶۸ و ۶۰۳، ۹۶۰ و ۱۰۴۰، ۱۰۹۰) قابل شناسایی است. همچنین پیکهای  $\text{CO}_3^{2-}$  و  $\text{HPO}_4^{2-}$  که در طیف استاندارد هیدروکسی آپاتیت وجود ندارد در طیف هر دو نمونه مشاهده می‌شود. در برخی منابع ذکر شده است که هیدروکسی آپاتیت زیستی شامل بنیانهای  $\text{CO}_3^{2-}$  (به صورت کربنات هیدروکسی آپاتیت) و  $\text{HPO}_4^{2-}$  است [۲۶ و ۲۷]. وجود این دو نوع بنیان در نمونه‌های تولید شده شباهت ساختار آنها را به هیدروکسی آپاتیت زیستی بیشتر می‌کند.

با توجه به الگوی طیف مادون قرمز با تبدیل فوریه مربوط به نمونه کلسینه نشده، شکل (۹) می‌توان مشاهده کرد که در این نمونه پیکهای مربوط به آب ( $\text{cm}^{-1}$  ۳۴۲۳، ۰۶ و ۱۶۳۶، ۵۳) عریض بوده و سطح زیر پیک آنها بالاست. وجود میزان بالای آب در نمونه و حضور ترکیبات کربن‌دار نشان می‌دهد که مقدار زیادی از ماده تولیدی به توده زیستی باکتری و مواد حاصل از باکتریها اختصاص دارد. به خصوص که پس از انجام عمل کلسینه کردن این نمونه در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد، شکل (۱۰) سطح زیر پیک آب به شدت کاهش می‌یابد در حالی که سطح زیر نمودار پیکهای مربوط به بنیان فسفات تغییری نمی‌کند. این امر نشانگر خروج ترکیبات آلی و آب از نمونه در اثر حرارت‌دهی در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد است. ذکر این نکته لازم است که پس از انجام عملیات کلسینه کردن هنوز پیک کربنات در طیف مادون قرمز با تبدیل فوریه ماده مشاهده



Absorbance (Wavenumber (cm-1))

شکل ۹- طیف مادون قرمز با تبدیل فوریه پودر هیدروکسی آپاتیت تولید شده.

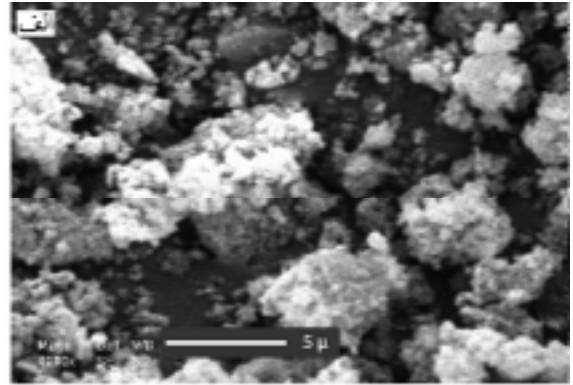
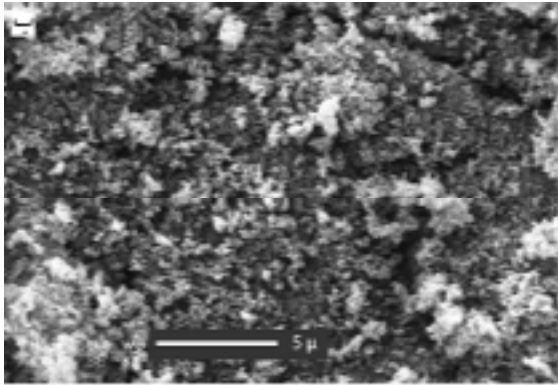


Absorbance (Wavenumber (cm-1))

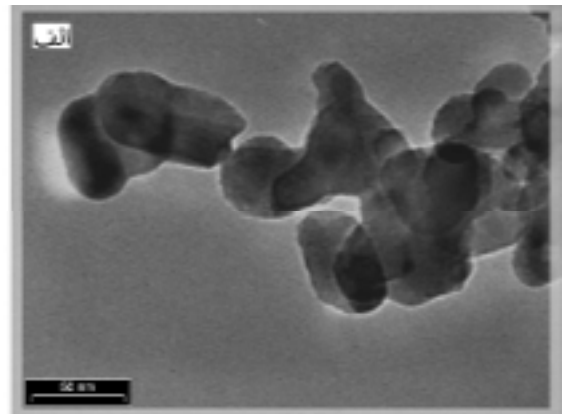
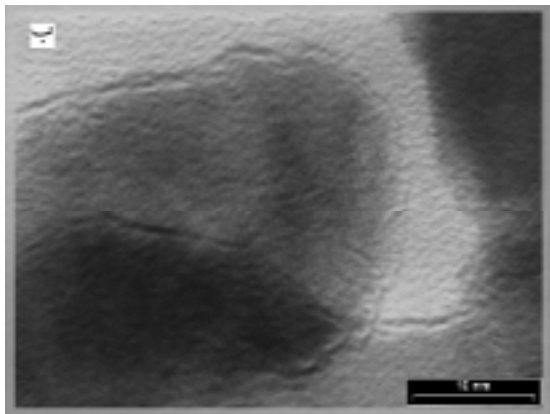
شکل ۱۰- طیف مادون قرمز با تبدیل فوریه پودر هیدروکسی آپاتیت تولید شده پس از کلسینه کردن در دمای ۶۰۰ درجه سانتی گراد.

جدول ۲- پیکهای شاخص مربوط به الگوی طیف مادون قرمز با تبدیل فوریه نمونه هیدروکسی آپاتیت استاندارد [۲۷] و نمونه‌های کلسینه نشده و کلسینه شده تولیدی.

PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>		OH <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>			CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	H <sub>2</sub> O		OH <sup>-</sup>	بنیان شیمیایی
۵۶۵	۶۰۳	۶۳۴	-	۹۶۰	۱۰۴۰	۱۰۹۰	-	-		۳۵۷۰	نمونه استاندارد
۵۶۲	۶۰۱	-	۸۷۵	۹۶۳	۱۰۳۳	نامشخص	۱۴۵۸	۱۶۳۸	۳۴۳۴	۳۵۶۸	نمونه کلسینه نشده
۵۶۶	۶۰۳	۶۳۳	۸۷۹	۹۶۱	۱۰۳۵	۱۰۹۰	۱۴۵۸	۱۶۳۶	۳۴۳۵	۳۵۶۹	نمونه کلسینه شده



شکل ۱۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از پودر هیدروکسی آپاتیت تولیدی؛ الف) پیش از کلسینه کردن، ب) پس از کلسینه کردن در دمای ۶۰۰ درجه سانتی گراد.



شکل ۱۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از پودر هیدروکسی آپاتیت تولیدی پس از انجام عمل کلسینه کردن در دمای ۶۰۰ درجه سانتی گراد در دو بزرگنمایی متفاوت.

می‌شود که این امر به دلیل خروج گازهای حاصل از سوختن و تبخیر مواد آلی و توده زیستی همراه با نمونه است. این امر نتیجه منحصراً به فرد حاصل از روش تولید باکتریایی است. با انجام عمل کلسینه کردن در دمای ۶۰۰ درجه سانتی گراد خوشه‌های آگلومره با اندازه تقریبی یک تا دو میکرومتر تشکیل می‌شود که نشان‌دهنده میزان پایین آگلومره شدن ذرات در این روش است، شکل (۱۱-ب).

### ۳-۵-۲- بررسی مورفولوژی و اندازه ذرات با میکروسکوپ الکترونی عبوری

شکل (۱۲-الف و ب) تصاویر میکروسکوپ الکترونی

می‌شود که این امر در اثر ورود کربن به ساختار هیدروکسی آپاتیت در اثر سوختن ترکیبات کربن‌دار در طی فرایند کلسینه کردن است.

### ۳-۵-۳- بررسی مورفولوژی و اندازه ذرات

#### ۳-۵-۱- بررسی مورفولوژی ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی

شکل (۱۱-الف و ب) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نمونه کلسینه نشده و کلسینه شده در دمای ۶۰۰ درجه سانتی گراد را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود با انجام عمل کلسینه کردن از اندازه خوشه‌های آگلومره کاسته

عبوری برای نمونه کلسینه شده در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد و حاکی از آن است که ذراتی با اندازه تقریبی ۲۵ تا ۳۰ نانومتر تولید شده است. ذرات دارای مورفولوژی شبه سوزنی‌اند و از این نظر به هیدروکسی‌آپاتیت زیستی شبیه هستند. همچنین مشاهده می‌شود که توزیع اندازه و شکل ذرات نسبتاً یکنواخت است. این امر می‌تواند هنگام ساخت قطعه از پودر هیدروکسی‌آپاتیت سبب تف‌جوشی یکنواخت تر و تولید قطعه‌ای با خواص مطلوبتر نسبت به قطعات ساخته شده از پودرهای میکرونی شود.

همان‌گونه که در تصویر (۱۲-ب) مشاهده می‌شود در یک دانه مشخص صفحات بلوری قابل رؤیت همگی با یکدیگر موازی هستند. موازی بودن صفحات در یک ذره پودر می‌تواند این نتیجه را در بر داشته باشد که هر ذره پودر از یک دانه بلوری تشکیل شده است. ضمن آنکه اندازه ذرات پودر مشاهده شده در تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری تقریباً با اندازه دانه به دست آمده از روش ویلیامسون-هال برابر است و این امر خود دلیل دیگری بر تک بلور بودن ذرات پودر تولیدی است.

هیدروکسی‌آپاتیت موجود در بافت استخوانی به صورت ذرات سوزنی شکل در شبکه الیاف کلاژن قرار گرفته است. نزدیک کردن مورفولوژی و اندازه ذرات و ترکیب شیمیایی پودر هیدروکسی‌آپاتیت تولیدی به هیدروکسی‌آپاتیت زیستی می‌تواند سبب افزایش قابل ملاحظه در رفتار زیست‌سازگاری و زیست‌فعالی قطعه ساخته شده از آن شود [۲۸]. پیش از این اشاره شد که نانومتری بودن ساختار هیدروکسی‌آپاتیت سبب افزایش فعالیت سلولهای استئوبلاست و در نتیجه زیاد شدن سرعت فرایند استخوان‌سازی می‌شود [۸-۱۰]. از طرف دیگر نانومتری بودن ذرات به افزایش خواص مکانیکی کاشتنی ساخته شده می‌انجامد [۴-۷]. همچنین نانومتری بودن ذرات برای استفاده از هیدروکسی‌آپاتیت به عنوان حامل محصولات زیستی در بدن ضروری است [۱۱-۱۲]. مجموع این عوامل نشان دهنده اهمیت ساخت پودر هیدروکسی‌آپاتیت با اندازه

نانومتری و مورفولوژی شبیه به هیدروکسی‌آپاتیت زیستی است. با توجه به نتایج به دست آمده پیرامون اندازه و شکل یکنواخت ذرات و میزان آگلومره شدن پایین آنها به نظر می‌آید که روش رسوب‌دهی زیستی روشی مناسب برای تولید هیدروکسی‌آپاتیت با ذرات نانومتری است. به‌ویژه آنکه در ترکیب شیمیایی هیدروکسی‌آپاتیت تولیدی بنیانهای شیمیایی مشابه با هیدروکسی‌آپاتیت زیستی وجود دارد و ذرات از مورفولوژی شبه سوزنی برخوردارند.

#### ۴- نتیجه‌گیری

پودر هیدروکسی‌آپاتیت نانومتری با استفاده از یک سویه بومی باکتری *سراشیا* تولید شد. ذرات هیدروکسی‌آپاتیت تولید شده تک بلور بود و اندازه و شکل نسبتاً یکنواختی داشت. میزان آگلومره بودن این ذرات نیز نسبت به پودرهای هیدروکسی‌آپاتیت تولید شده به روشهای معمول پایینتر بود. اندازه و شکل یکنواخت ذرات و میزان آگلومره شدن پایین آنها سبب می‌شود تا بتوان کاشتینها با خواص مکانیکی بالاتر تولید کرد. همچنین پودر هیدروکسی‌آپاتیت تولید شده دارای بنیانهای آلی موجود در هیدروکسی‌آپاتیت زیستی بود. وجود این بنیانهای آلی و در کنار آن اندازه نانومتری ذرات سبب افزایش زیست‌سازگاری و زیست‌فعالی هیدروکسی‌آپاتیت تولیدی می‌شود.

بالاترین میزان تولید رسوب در مورد نمونه‌های تولید شده در محلول سوبسترا با درجه اسیدی برابر هشت و گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. همچنین مشاهده شد در الگوی پراش پرتو ایکس پودر تولیدی در محلول سوبسترا با درجه اسیدی برابر هشت و گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد پیکها بیشترین میزان شدت و تیزی را نسبت به سایر نمونه‌ها دارند. عملیات کلسینه کردن در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد می‌تواند سبب افزایش بلورینگی پودر تولیدی و از طرف دیگر کاهش اندازه خوشه‌های آگلومره آن شود.

## قدردانی

نویسندگان این مقاله وظیفه خود می‌دانند که از مساعدتهای دانشکده مهندسی مواد و گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان و حمایت ستاد ویژه توسعه فناوری نانو ریاست جمهوری برای انجام این پژوهش قدردانی کنند.

پودر هیدروکسی آپاتیت تولید شده به روش زیستی انتخاب مناسبی برای ساخت کاشتیهایی مورد استفاده در پزشکی و دندانپزشکی و ترمیم و بازسازی ضایعات استخوانی است. با توجه به اندازه نانومتری ذرات پودر هیدروکسی آپاتیت تولیدی به نظر می‌آید که بتوان از آن در رسانش محصولات دارویی و زیستی در بدن استفاده کرد.

## مراجع

1. Vallet-Regi, M., and Gonzalez-calbet, J. M., "Calcium Phosphates as Substitution of Bone Tissues," *Progress in Solid State Chemistry*, Vol. 32, pp. 1-31, 2004.
2. Gabriel, C. T. M., Orton, D. G., Hollister, S. J., Feinberg, S. E., J. and Halloran, W., "Mechanical and In-Vivo Performance of Hydroxyapatite Implants with Controlled Architectures", *Biomaterials*, Vol. 23, pp. 1283-1293, 2002.
3. Murray, M.G.S., et al., "An Improvement in Processing of Hydroxyapatite Ceramics," *Journal of Materials Science*, Vol. 30, pp. 3061-3074, 1995.
4. Sarig, S., and Kahana, F., "Rapid Formation of Nanocrystalline Apatite," *Journal of Crystal Growth*, Vol. 237, pp. 55-59, 2002.
5. Legeros, R., "Biodegradation and Bioresorption of Calcium Phosphate Ceramics," *Clinical Materials*, Vol. 14, pp. 65-68, 1993.
6. Yeong, K.C.B., and Wang, J., "Fabricating Densified Hydroxyapatite Ceramics from a Precipitated Precursor," *Materials Letter*, Vol. 38, pp. 208-213, 1999.
7. Stupp, S.I., and Ciegler, G.W., "Organoapatites: Materials for Artificial Bone," *Journal of Biomedical Materials Resource*, Vol. 26, pp. 169-183, 1992.
8. Webster T.J., Siegel R.W., and Bizios R., "Enhanced Surface and Mechanical Properties of Nano Phase Ceramics to Achieve Orthopaedic/dental Implant Efficacy," *Key Engineering Materials*, Vol. 192-195, pp. 321-324, 2001.
9. Webster T.J., Ergun C., Doremus R.H., Siegel R.W., and Bizios R., "Enhanced Functions of Osteoblasts on Nanophase Ceramics," *Biomaterials*, Vol. 21, pp. 1803-1810, 2000.
10. Webster T.J., "Specific Proteins Mediate Enhanced Osteoblast Adhesion on Nanophase Ceramics," *Journal of Biomedical Materials Resource*, Vol. 51, pp. 475-483, 2000.
11. Akahane, M., et al., "Hydroxyapatite Ceramics as a Carrier of Gene-transduced Bone Marrow Cells," *Journal of Orthopedic Science*, Vol. 7, pp. 677-682, 2002.
12. Zhu, S.H., "Hydroxyapatite Nanoparticles as a Novel Gene Carrier," *Journal of Nanoparticle Research*, Vol. 6, pp. 307-311, 2004.
13. Thackray, A.C., et al., "Bacterial Biosynthesis of a Calcium Phosphate Bone-substitute Material," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 15, pp. 403-406, 2004.
14. Bigi, A., Boanini, E., and Rubini, K., "Hydroxyapatite Gels and Nanocrystals Prepared Through a Sol-gel Process," *Journal of Solid State Chemistry*, Vol. 177, pp. 3092-8, 2004.
15. Kuo, M.C., and Yen, S.K., "The Process of Electrochemical Deposited Hydroxyapatite Coating on Biomedical Titanium at Room Temperature," *Materials Science and Engineering C*, Vol. 20, pp. 153-160, 2000.
16. E. Baeuelein, *Biomaterialization*, 2<sup>nd</sup> Ed, Wiley-VCH, Germany, 2004.
17. Goodsell, D.S., *Bionanotechnology*, pp. 181-184, Wiley-LISS, USA, 2004.
18. Macaskie, L.E., et al., "A Novel non Line-of-Sight Method for Coating Hydroxyapatite onto the Surfaces of Support Materials by Biomaterialization," *Journal of Biotechnology*, Vol. 118, pp. 187-200, 2005.
19. Pompei, R., Cornaglia, G., Ingianni, A., and Satta, G., "Use of a Novel Phosphatase Test for Simplified Identification of Species of the Tribe *Proteeae*," *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 6, pp. 1214-1218, 1990.
20. Soro, O., et al., "Phosphatase Activity of *Staphylococci* is Constitutive in Some species and Repressed by Phosphate in others," *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 28, pp. 2707-2710, 1990.
21. Pang, Y.X., and Bao, X., "Influence of Temperature, Ripening Time and Calcination on the Morphology and Crystallinity of Hydroxyapatite Nanoparticles," *Journal of the European Ceramic Society*, Vol. 23, pp. 1697-1704, 2003.
22. Satta, G., et al., "Phosphatase Activity is a Constant Feature of all Isolates of all Major Species of the Family Enterobacteriaceae," *Journal of Clinical*

- Microbiology*, Vol. 26, pp. 2637-2641, 1988.
23. JCPDS Card No. 9-432, 1994.
24. ASTM, Annual Book of ASTM Standards, Section 13 F, pp. 1185- 1188, 1990.
25. Kalita, S. J., Bose, S., Hosick, H.L., and Bandyopadhyay, A., "Nanocrystalline Calcium Phosphate Ceramics in Biomedical Engineering," *Journal of Materials Resource*, Vol. 17, pp. 3042-3046, 2002.
26. Xiaoying, L., Yongbin, F., Duchun, G., and Wei, C., "Preparation and Characterization of Natural Hydroxyapatite from Animal Hard Tissue," *Key Engineering Materials*, Vol. 342-343, pp. 213- 216, 2007.
27. Tsuda, H., "Raman Spectra of Human Dentin Mineral," *European Journal of Oral Science*, Vol. 104, pp. 123-131, 1996.
28. Ferraz M.P., Monterio F.J., and Manuel C.M., "Hydroxyapatite Nanoparticles: A Review of Preparation Methodologies," *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*, Vol. 2, pp. 74-80, 2004.