

ПОЛИМЕРНЫЕ, БИООРГАНИЧЕСКИЕ  
И ГИБРИДНЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ

УДК 541.6+544.1

3D-ПЕЧАТЬ ГИДРОГЕЛЕМ НА ОСНОВЕ ЙОТА-КАРРАГИНАНА  
С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ  
*Chlorella vulgaris*

© 2023 г. В. А. Захарова<sup>1,\*</sup>, П. М. Готовцев<sup>2,3</sup>, П. А. Полетаева<sup>1</sup>, А. Г. Рогов<sup>2</sup>, Н. Р. Кильдеева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина, Москва, Россия

<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),  
Долгопрудный, Россия

\*E-mail: vasilinaqss@gmail.com

Поступила в редакцию 05.10.2022 г.

После доработки 31.10.2022 г.

Принята к публикации 31.10.2022 г.

На основании исследования температурной зависимости процесса гелеобразования водных растворов каррагинана установлены технологические параметры отверждения гидрогелевых “чернил” на основе растворов полисахарида каррагинана. С целью создания материала, являющегося дополнительным источником кислорода и средством реабилитации загрязненных вод в замкнутых экосистемах, продемонстрированы возможности 3D-биопечати матричных структур, содержащих иммобилизованные клетки микроводорослей *Chlorella vulgaris*.

DOI: 10.56304/S199272232301020X

## ВВЕДЕНИЕ

Технологии с использованием фототрофных микроорганизмов находят широкое применение в самых различных сферах деятельности человека. Способность фототрофных микроорганизмов в процессе роста фиксировать значительное количество углекислого газа и делать это более интенсивно, чем высшие растения, дает возможность использовать их в качестве элементов системы нормализации воздуха в городских агломерациях [1, 2]. Конструкция фотобиореактора, в котором происходит культивирование фототрофных микроорганизмов, выбирается в зависимости от задач и, как правило, представляет собой крупную гидравлическую систему, где происходит принудительная циркуляция культуральной жидкости с биомассой [3]. В то же время ведется поиск доходов к созданию компактных систем для применения в помещениях, чтобы обеспечить максимальный выход кислорода. В случае небольших систем производительность по биомассе будет невысокой и зачастую не ставится задача ее собирать. Для подобных систем обсуждается возможность использования фотобиореакторов с иммобилизованными на каком-либо носителе фототрофными микроорганизмами [4]. Следующим шагом в развитии является создание материала с иммобилизованными микроорганизмами, такого, который за счет своих свойств

обеспечивал бы поддержание необходимой для микроорганизмов среды [5]. Для решения этой задачи микроорганизмы можно иммобилизовать в гидрогеле: в ряде работ были показаны возможность успешной иммобилизации бактериальных клеток в гель и последующая печать полученной композицией [6–8].

3D-печать – это быстроразвивающаяся современная аддитивная технология, оказывающая революционное влияние на изготовление изделий целевого назначения с заданными размерами, формами и свойствами [9]. В процессе развития аддитивных технологий появилась возможность использовать в качестве “чернил” концентрированные растворы полимеров или гидрогели [10] с гибкими и организованными сетками и получать каркасные структуры для поддержания жизнедеятельности и пролиферационной активности организмов. Данное направление получило название 3D-биопечати. В направлении биопечати можно выделить две большие группы: 3D-печать “чернилами” на основе полисахаридов и белков или печать “чернилами”, содержащими клеточный материал. В основе обоих методов лежит послойное нанесение биоматериала – биополимерной питательной среды, поддерживающей жизнеспособность клеточного материала, с последующим формированием объекта заданной формы по готовой 3D-модели [11].

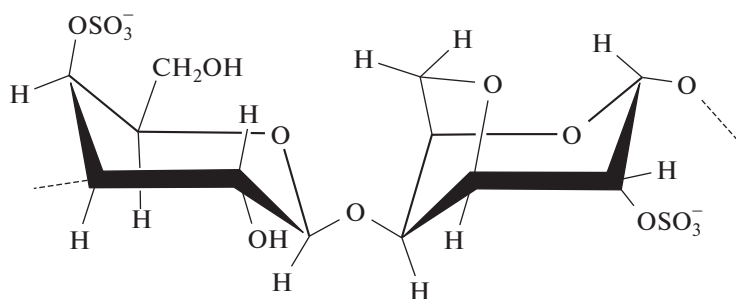


Рис. 1. Структура йота-каррагинана.

Проблемы существующих способов и технологий получения биополимерных матриц на основе гидрогелей связаны с необходимостью контроля кинетики отверждения гидрогелевых структур в процессе печати или быстрого отверждения гидрогелевых напечатанных каркасных структур. В этой связи перспективным гелеобразующим биополимером является полисахарид красных водорослей – йота-каррагинана. Особенности строения йота-каррагинана (рис. 1) определяют его растворимость в воде и температурно-зависимую способность к гелеобразованию.

В настоящей работе с целью определения технологических параметров отверждения гидрогелевых чернил в процессе 3D-биопринта каркасных матриц, содержащих микроводоросли, исследована температурная зависимость процесса гелеобразования водных растворов каррагинана.

## МЕТОДЫ

**Культивирование микроводорослей.** Штамм микроводоросли *Chlorella vulgaris* GKV1 из коллекции НИЦ “Курчатовский институт” предварительно культивировали на среде BBM со следующими концентрациями компонентов (г/л):  $\text{KNO}_3$  – 1.25,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1.25,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,  $\text{CaCl}_2$  – 0.0835,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0.1142,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.0498,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.0882,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0.0144,  $\text{MoO}_3$  – 0.0071,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0.0157,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0.0049,  $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$  – 0.5. Культивирование проводили в 500 мл колбах Эрленмейера с объемом среды 200 мл.

**Приготовление гидрогелевых чернил на основе раствора каррагинана заданной концентрации.** Рабочие растворы каррагинана с концентрацией (2, 2.5 и 3%) готовили путем растворения навески йота-каррагинана (Sigma-Aldrich, США) ( $\pm 0.0001\text{г}$ ) в дистиллированной воде при  $70^\circ\text{C}$  и перемешивании ( $200\text{ с}^{-1}$ ).

**Приготовление гидрогелевых биочернил на основе *i*-каррагинана, содержащего микроводоросли.** Гидрогелевые биочернила, содержащие растительный клеточный материал, готовили путем введе-

ния *C. vulgaris* в питательной среде BBM в гель каррагинана с концентрацией при  $70^\circ\text{C}$  и перемешивании ( $2000\text{ об./мин}$ ).

**Изучение гелеобразования в растворах каррагинана.** Изучение кинетики процесса гелеобразования проводили путем измерения динамической вязкости растворов каррагинана заданной концентрации при равномерно понижающейся температуре с использованием анализатора вязкости SV-10 (AND, Япония) с постоянной частотой вибрации, равной 30 Гц. Для этого термостойкую кювету вибровязкозиметра наполняли горячим раствором полимера ( $\sim 70^\circ\text{C}$ ). Затем чувствительный элемент, оснащенный температурным датчиком, погружали в жидкую среду кюветы. Устройство фиксировало сигналы изменения вязкости при снижении температуры растворов каждые 15 с. Измерения останавливали по мере образования стабильного гидрогеля и достижения предельного значения, ограниченного показанием прибора, равным  $14000\text{ мПа}\cdot\text{с}$ .

**Определение энергии активации вязкого течения при гелеобразовании.** Энергию активации при изучении процесса гелеобразования рассчитывали с использованием уравнения Аррениуса–Френкеля [12]:

$$\eta = \eta_0 \cdot \exp\left(\frac{E_a}{R \cdot T}\right), \quad (1)$$

где  $\eta$  – вязкость,  $\eta_0$  – постоянная,  $E_a$  – энергия активации,  $R$  – универсальная газовая постоянная ( $R = 8.314\text{ кДж}/(\text{моль} \cdot \text{K})$ ),  $T$  – термодинамическая температура.

Исходя из полученных данных изменения показателей вязкости растворов различной концентрации во времени, в установленном температурном диапазоне строится график зависимости в координатах  $\ln \eta = f(1/T)$ , на котором искомый параметр определяется по тангенсу  $\alpha$  угла наклона линейной зависимости:

$$E_a = Rtg\alpha. \quad (2)$$

**Получение гидрогелевых каркасных образцов методом 3D-биопринта.** 3D-биопринтер (Pharm-

Print, Россия), представленный на рис. 2, состоит из подвижного стола с креплениями для чашек Петри, поршневого шприцевого дозатора, положение которых друг относительно друга управляется по осям  $X$  и  $Y$  в плоскости и по оси  $Z$  по вертикали в пределах 250, 150 и 100 мм соответственно. Механизм привода состоит из оснастки для смены одноразового поршневого дозатора, шагового двигателя и линейной направляющей, обеспечивающей передачу вращательного движения в поступательное, обеспечивая равномерное дозирование геля.

Получение гидрогелевого каркаса осуществляли посредством равномерной поршневой экструзии “чернил” на основе водного раствора йота-каррагинана на поверхность чашки Петри при заданных параметрах печати.

**Термогравиметрия.** С помощью термогравиметрического анализатора (ТА) методом Ramp определяли изменение массы пробы гидрогелей каррагинана, а также гидрогелей, содержащих микроводоросли, полученных методом 3D-био-печати, в процессе нагрева на установке TGAQ50 (TA Instruments, США). Скорость нагрева составляла  $15.00^\circ\text{C}/\text{мин}$ . Среда газовая – воздух, суммарная скорость подачи которого составляла  $100.0\text{ мл}/\text{мин}$ . Температурный диапазон от 25 до  $250^\circ\text{C}$ . Степень изменения массы определяли с точностью до 0.5%.

**Микроскопия.** Визуализацию клеток микроводорослей в гелях проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus BX-61 (Япония), снабженного иммерсионным объективом  $100\times$  UPlanFL (NA 1.30) и камерой Olympus DP71 (Япония), под управлением программного обеспечения CellA (Olympus, Япония). Обработку изображений проводили с помощью ICY software [13].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В основе процесса гелеобразования в растворах полисахаридов лежат механизмы, вызывающие формирование стабильной или термообратимой трехмерной сетки, причем характер и число узлов сетки зацеплений определяют реологические и механические свойства геля. Для технологии 3D-печати важно определить условия, при которых раствор полимера проявляет способность к течению, но обладает значительной вязкостью и может использоваться в качестве печатных “чернил”, и параметры перехода к упругому телу матрикса, форма которого задана и адаптирована для считывания 3D-биопринтером.

Для гидрогелей полисахаридов, получаемых без использования сшивающих реагентов, зоны соединения макромолекулярных цепей включают в себя агрегаты участков макромолекул [14].



Рис. 2. Поршневой гидрогелевый 3D-биопринтер компании PharmPrint.

Связи, участвующие в образовании таких агрегатов, обычно представляют собой нековалентные взаимодействия, такие как водородные связи, гидрофобные взаимодействия, ионные связи и т.д. Гелеобразующие формы каррагинана, к которым относится йота-каррагинан, формируют устойчивые при определенной температуре гидрогели за счет образования водородных связей; число таких связей зависит от концентрации раствора, молекулярной массы полисахарида и pH [15]. Для определения температурно-концентрационной области использования водных растворов йота-каррагинана в качестве “чернил” при получении стабильных матричных структур путем поршневой 3D-био-печати был использован метод вискозиметрии.

В процессе охлаждения получены температурные зависимости показателей динамической вязкости растворов каррагинана с концентрацией 2, 2.5 и 3%. Кривые охлаждения, представленные на рис. 3, показывают устойчивый рост вязкости всех исследуемых растворов при снижении температуры. С увеличением содержания каррагинана в исследуемых растворах увеличиваются эффективные значения динамической вязкости и температуры эквивязких растворов. Значительное увеличение вязкости растворов при снижении температуры (рис. 4) связано с изменением структуры каррагинана в водном растворе путем включения макромолекул полисахарида в трехмерную агрегированную структуру, внутри которой обеспечивается свободное перемещение молекул воды, что позволяет рассматривать раствор

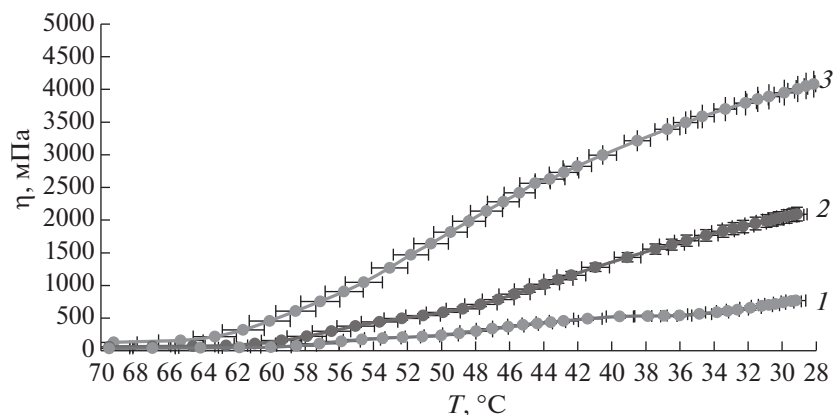


Рис. 3. Кривые охлаждения водных растворов йота-каррагинана концентрации 2 (1), 2.5 (2) и 3% (3).

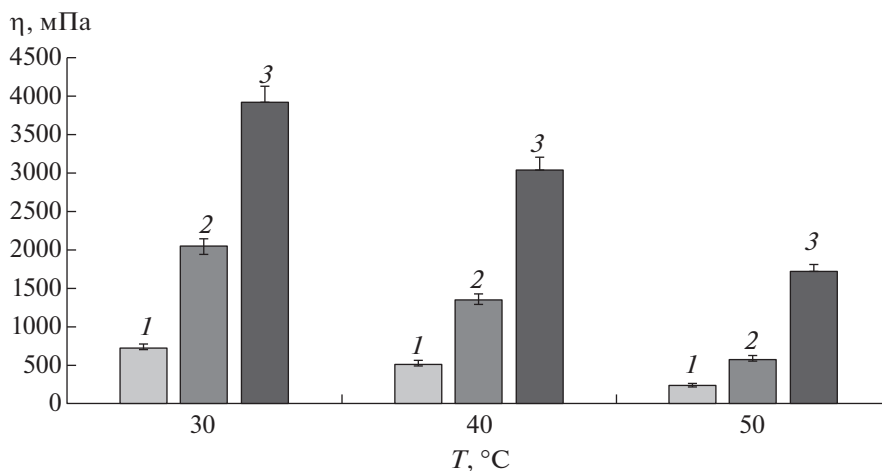


Рис. 4. Влияние температуры на показатели динамической вязкости растворов каррагинана. Концентрация раствора каррагинана 2 (1), 2.5 (2) и 3% (3).

каррагинана в качестве перспективного высокогидратированного биопечатного материала.

Из полученных кривых охлаждения видно, что степень изменения вязкости, измеренной на вибрационном вискозиметре, в разных температурных интервалах различна. Энергия активации вязкого течения определяется как минимальная энергия, необходимая для преодоления энергетического барьера и начала перемещения сегментов макромолекул, обеспечивающего течение. Были выделены температурные области линейного изменения вязкости в координатах Аррениуса (рис. 5) и рассчитаны значения энергии активации вязкого течения  $E_{a1}$  и  $E_{a2}$ , которые имели близкие значения для растворов разных концентраций, но сильно различались в разных температурных областях (табл. 1).

Это различие связано с разной прочностью флуктуационной сетки, разрушением которой определяется активационный процесс деформа-

ции при течении раствора. В области температур от 42 до 60°C для 3%-ного раствора и от 36 до 50°C для 2 и 2.5%-ных растворов каррагинана образуется большое число водородных связей, и энергия активации достигает 160–196 кДж/моль, что превышает характерные для вязкого течения значения [16], поэтому можно принять, что  $E_{a2}$  характеризует процесс гелеобразования – начало формирования устойчивой трехмерной сетки. Значения температур начала гелеобразования, полученные из координаты точки пересечения прямых, аппроксимирующих зависимость вязкости от температуры в координатах Аррениуса, приведенные в табл. 1, показывают, что в исследуемом диапазоне концентраций формирование гидрогеля начинается при температуре  $50 \pm 1^\circ\text{C}$  и не зависит от концентрации каррагинана. При дальнейшем понижении температуры деформирующие напряжения приводят к нарушению целостности гидрогеля каррагинана.

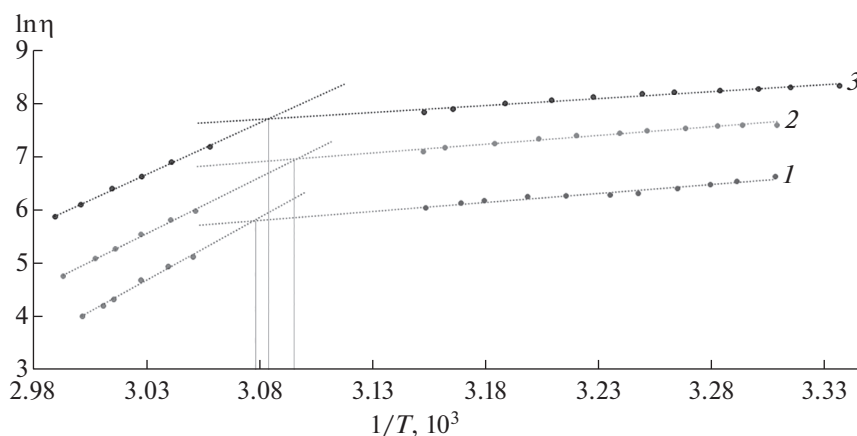


Рис. 5. Зависимость вязкости водного раствора каррагинана от температуры в координатах Аррениуса; концентрация раствора каррагинана – 2 (1), 2.5 (2) и 3% (3).

Характер образования физического геля в растворах за счет водородных мостиков между макромолекулами йота-каррагинана определяет не только его фазовое состояние, но и физико-механические и физико-химические свойства. С использованием биопринтера были получены образцы гидрогелей из растворов разной концентрации. Значения модуля упругости гидрогелей каррагинана, полученные в режиме сжатия на адаптированной для исследования гидрогелей установке Instron 5965 (США), увеличиваются от 7.7 для образца, полученного из 2%-ного раствора, до 18.9 кПа для 3%-ного гидрогеля каррагинана (табл. 2).

По-видимому, концентрация раствора йота-каррагинана оказывает влияние не столько на температуру гелеобразования, сколько на число водородных связей, обеспечивающих зацепления трехмерной сетки, поддерживающей структуру гидрогеля.

Включение микроводоросли *C. vulgaris* в структуру гидрогелей проводили методом 3D-биопечати с использованием в качестве чернил дисперсии биоматериала в 2.5%-ном водном растворе йота-каррагинана. Фотографии образцов приведены на рис. 6.

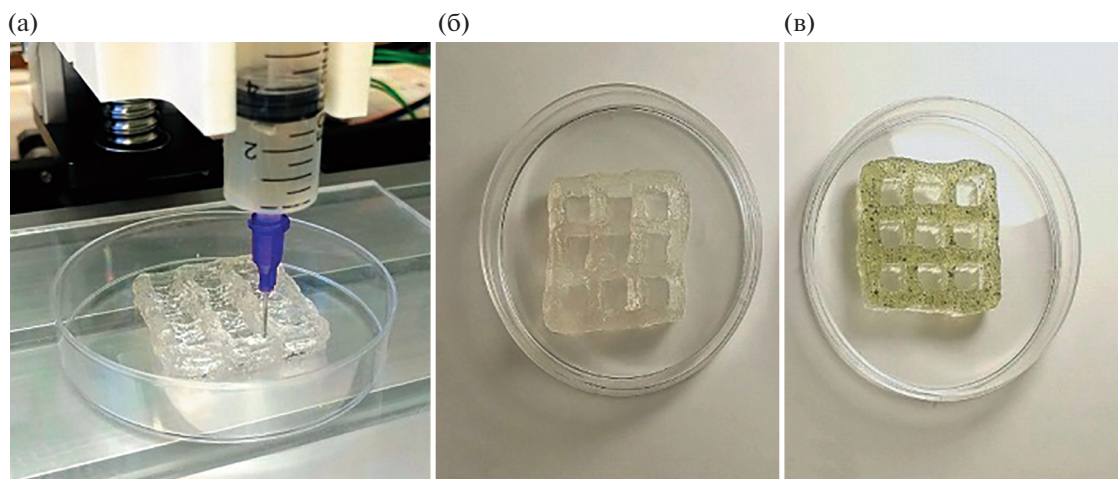
Изучение термической деградации исходных гидрогелей йота-каррагинана и гидрогелевых материалов, содержащих микроводоросли, прово-

дили в процессе нагрева от 25 до 250°C (рис. 7). Гидрогели находились в стабильном термическом состоянии от 0 до ~70°C, после чего наблюдался процесс уменьшения массы геля, сопровождающийся потерей влаги. При введении клеток *C. vulgaris* процесс начала потери влаги смещается в область более высоких температур, чему может способствовать как удержание влаги в геле микроводорослями за счет межмолекулярного взаимодействия между полисахаридсодержащей клеточной стенкой микроводорослей и каррагинаном, так и формирование более плотной структуры геля за счет комплексообразования каррагинана с ионами металлов, входящих в состав культуральной среды [17]. Дальнейший процесс потери массы гидрогеля каррагинана сопровождается разрушением сетки геля, фрагментацией полисахаридного скелета, завершающейся в конечном итоге разложением, температура которого составляет 183°C. При введении клеток *C. vulgaris* этот показатель увеличивается до 207°C, что также может свидетельствовать о наличии взаимодействия каррагинана с клеточной стенкой микроводорослей. При этом скорость потери массы гидрогелей каррагинана при увеличении температуры составила 17%/мин, а при введении клеток микроводорослей – 21.5%/мин.

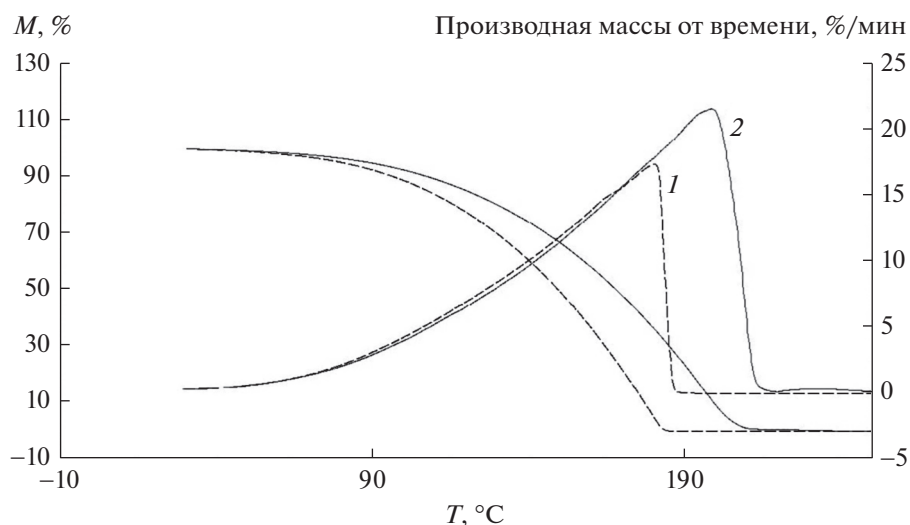
Визуализация клеток микроводорослей *C. vulgaris* представлена на рис. 8. Различия в четкости

Таблица 1. Значения энергии активации

Концентрация, %	$E_{a1}$ , кДж/моль	$E_{a2}$ , кДж/моль	Температура начала гелеобразования, °C
2	27.8	196.0	51.2
2.5	26.9	175.0	49.9
3	21.8	160.7	51.7



**Рис. 6.** Процесс 3D-печати 2.5%-ным гидрогелем йота-каррагинана (а); напечатанный гидрогелевый скаффолд (б); напечатанный матрикс, содержащий *C. vulgaris* (в).



**Рис. 7.** Термограммы гидрогелевых образцов: 1 – исходного 2.5%-ного каррагинана (сплошная кривая), 2 – 2.5%-ного каррагинана, наполненного клетками *C. vulgaris* (пунктирная кривая).

клеток в поле зрения связаны с трехмерной структурой геля, где клетки расположены в различных плоскостях относительно фокальной плоскости. Аутофлуоресценция хлорофилла в клетках микроводорослей говорит о сохранности

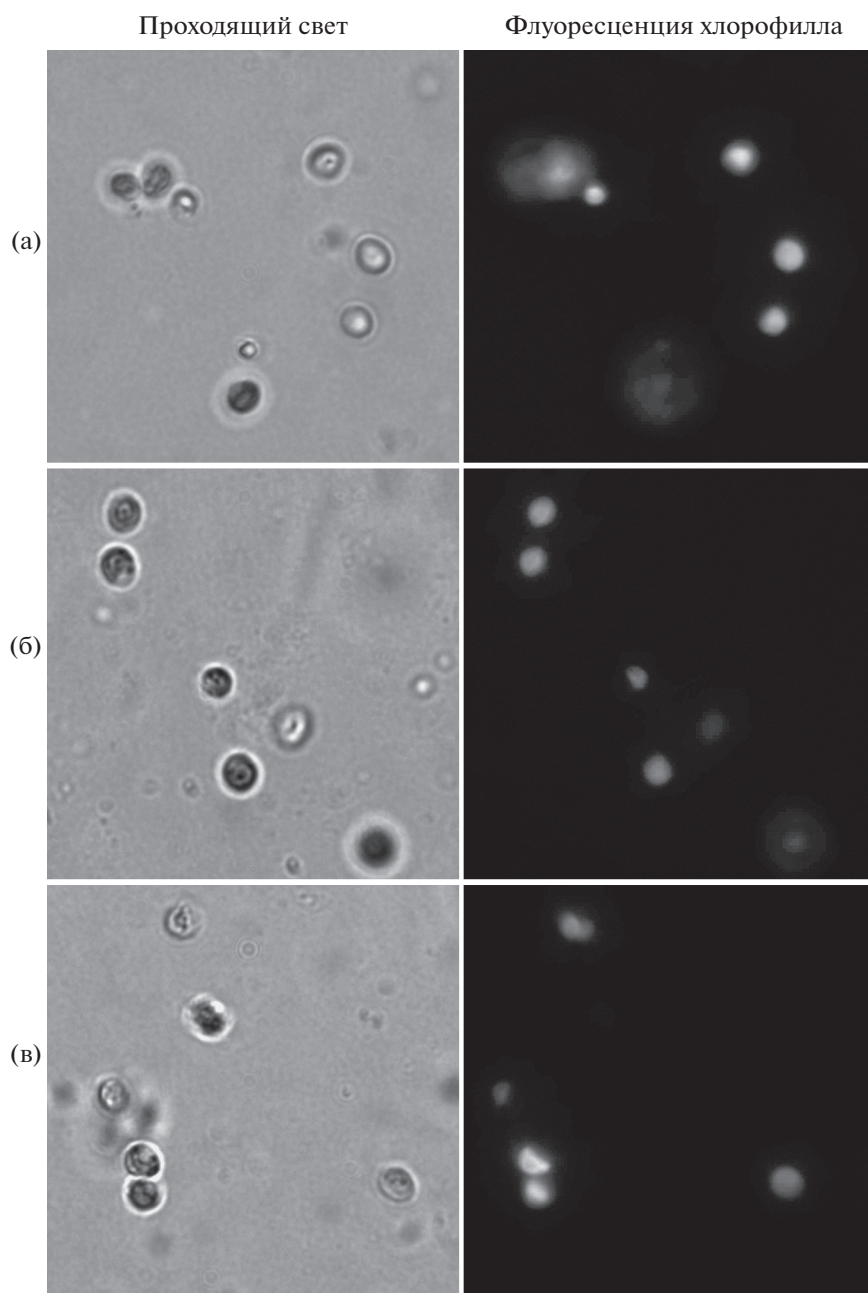
клеток в геле и отсутствии факторов, ингибирующих продукцию хлорофилла.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

3D-печать гидрогелями является крайне перспективным направлением, так как позволяет создавать трехмерные конструкции, содержащие в себе живые клетки. Гидрогель на основе каррагинана может выступать как перспективный носитель клеток фототрофных микроорганизмов, в частности микроводорослей *C. vulgaris*. Гидрогели могут поддерживать гомеостаз клеток и обеспечить их выживаемость. С учетом прочностных свойств представленный в работе биогбридный материал можно рассматривать как биофильтр

**Таблица 2.** Зависимость физико-механических показателей

Концентрация, %	Модуль упругости, кПа
2	7.7
2.5	10.5
3	18.9



**Рис. 8.** Участок геля, содержащий клетки *C. vulgaris* (слева); аутофлуоресценция хлорофилла в клетках микроводорослей (справа); а–в – три разных поля зрения, показывающих характерные количества клеток в геле.

для фиксации углекислого газа и генерации кислорода в помещениях. Дальнейшие исследования будут направлены на доработку материала для длительной эксплуатации и изучение выживаемости при этом клеток.

Авторы выражают благодарность генеральному директору компании ООО “PharmPrint” В.В. Гордееву за предоставление и неоценимую помощь с 3D-биопринтером.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Talaei M., Mahdavinnejad M., Azari R. et al. // Sustain. Energy Technol. Assessments. 2022. V. 52. P. 101894. <https://doi.org/10.1016/J.SETA.2021.101894>*
2. *Gotovtsev P.M., Dyakov A.V. // IEEE 3rd World Forum Internet Things. IEEE. 2016. P. 542. <https://doi.org/10.1109/WF-IoT.2016.7845476>*
3. *Pruvost J., Le Gouic B., Lepine O. et al. // Chem. Eng. J. 2016. V. 284. P. 850. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.08.118>*

4. *Dębowski M., Krzemieniewski M., Zieliński, M. et al.* // Atmosphere. 2021. V. 12. № 8. P. 1031. <https://doi.org/10.3390/atmos12081031>
5. *Gotovtsev P.* // Appl. Sci. 2020. V. 10. № 11. P. 3990. <https://doi.org/10.3390/APP10113990>
6. *Schaffner M., Rühls P.A., Coulter F. et al.* // Sci. Adv. 2017. V. 3. № 12. P. eaa06804. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao6804>
7. *Bader C., Patrick W.G., Oxman N. et al.* // 3D Printing and Additive Manufacturing. 2016. V 3. № 2. P. 79. <https://doi.org/10.1089/3dp.2016.0027>
8. *Smith R.S.H., Bader C., Oxman N. et al.* // Adv. Funct. Mater. 2020. V. 30. № 7. P. 1907401. <https://doi.org/10.1002/adfm.201907401>
9. *Shahrubudin N., Lee T.C., Ramlan R.* // Procedia Manuf. 2019. V. 35. P. 1286. <https://doi.org/10.1002/anie.201403192>
10. *Singh M., Haring A.P., Johnson B.N.* // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2019. V. 11. № 6. P. 6652. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b22164>
11. *Mandrycky C., Wang Z., Kim K., Kim D. H.* // Biotechnol. Adv. 2016. V. 34. № 4. P. 422. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>
12. *Appel E.A., Forster R.A., Scherman O.A. et al.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2014. V. 53. № 38. P. 10038. <https://doi.org/10.1002/anie.201403192>
13. *De Chaumont F., Dallongeville S., Olivo-Marin J.C. et al.* // Nature Methods. 2012. V. 9. № 7. P. 690. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2075>
14. *Nishinari K., Zhang H., Ikeda S.* // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2000. V. 5. № 3–4. P. 195. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(00\)00053-4](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(00)00053-4)
15. *Brenner T., Tuvikene R., Nishinari K. et al.* // Food Hydrocolloids. 2014. V. 39. P. 272. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.024>
16. *Zaim S., Mortadi A., El Moznine R. et al.* // Iranian Polym. J. 2020. V. 29. № 12. P. 1137. <https://doi.org/10.1007/s13726-020-00867-9>
17. *Hossain K.S., Miyanaga K., Maeda H., Nemoto N.* // Biomacromolecules. 2001. V. 2. № 2. P. 442. <https://doi.org/10.1021/bm000117f>