

Ảnh hưởng của nhiệt độ bảo quản đến khả năng in của mực sinh học gelatin-alginate

Phan Thị Hiếu Nghĩa^{1,2,3,*}, Trần Thị Mai Trinh^{2,3}, Trần Ngọc Quyển⁴, Trần Lê Bảo Hà^{1,2,3}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

¹Phòng thí nghiệm Kỹ nghệ mô và Vật liệu Y Sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Bộ môn Sinh lý học và Công nghệ sinh học Động vật, Khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁴Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

Liên hệ

Phan Thị Hiếu Nghĩa, Phòng thí nghiệm Kỹ nghệ mô và Vật liệu Y Sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Bộ môn Sinh lý học và Công nghệ sinh học Động vật, Khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Email: phtnghia@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 14-3-2025
- Ngày sửa đổi: 06-8-2025
- Ngày chấp nhận: 05-11-2025
- Ngày đăng: xx-xx-xxxx

DOI:



TÓM TẮT

Mực sinh học đóng vai trò quan trọng trong công nghệ in ba chiều, ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng, độ chính xác và tính toàn vẹn của cấu trúc in. Khả năng in là một trong những yếu tố then chốt quyết định sự thành công của quá trình in, yếu tố này ảnh hưởng đến độ chính xác của cấu trúc in và khả năng duy trì hình dạng mong muốn trong quá trình in ba chiều. Khả năng in của mực sinh học không chỉ phụ thuộc vào thành phần mà còn bị tác động đáng kể bởi điều kiện bảo quản. Do đó, việc đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ bảo quản đến khả năng in của mực sinh học là cần thiết. Bài báo trình bày cách đánh giá ảnh hưởng của ba điều kiện nhiệt độ bảo quản: nhiệt độ đông lạnh ($-20 \pm 1^\circ\text{C}$), nhiệt độ lạnh ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) và nhiệt độ phòng ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) đến khả năng in của mực sinh học gelatin-alginate (B-GA) trong thời gian 21 ngày. Khả năng in được đánh giá thông qua trạng thái mực, khả năng tạo sợi, chỉ số đồng dạng (U), độ hòa lẫn cấu trúc (Df) và khả năng in lỗ (Pr). Kết quả cho thấy khả năng in của mực B-GA duy trì ổn định trong 14 ngày đầu ở cả ba điều kiện bảo quản. Tuy nhiên, sau 21 ngày, khả năng in suy giảm ở điều kiện bảo quản ở nhiệt độ đông lạnh và nhiệt độ phòng, với chỉ số Pr giảm xuống còn $0,8469 \pm 0,0056$ và $0,8630 \pm 0,0074$, tương ứng. Ngược lại, ở điều kiện bảo quản ở nhiệt độ lạnh ($4 \pm 1^\circ\text{C}$), mực sinh học B-GA vẫn duy trì khả năng in ổn định trong suốt 21 ngày với chỉ số $\text{Pr} = 0,908 \pm 0,0227$. Như vậy, điều kiện bảo quản lạnh ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) là tối ưu để duy trì khả năng in của mực sinh học B-GA trong 21 ngày.

Từ khoá: bảo quản, gelatin-alginate, in ba chiều, khả năng in, mực sinh học

MỞ ĐẦU

Công nghệ in ba chiều (3D printing) đang phát triển mạnh mẽ và trở thành một hướng nghiên cứu tiềm năng trong lĩnh vực y sinh, đặc biệt trong kỹ nghệ mô và y học tái tạo. Công nghệ này cho phép chế tạo các cấu trúc sinh học có độ chính xác cao, mô phỏng mô và cơ quan thật để phục vụ nghiên cứu được lý, thử nghiệm thuốc cũng như ứng dụng trong cấy ghép y khoa^{1,2}. Một trong những yếu tố quyết định thành công của in 3D là chất lượng của mực sinh học (bioink), vì nó ảnh hưởng trực tiếp đến độ chính xác, tính toàn vẹn cấu trúc và khả năng duy trì hình dạng của vật liệu in trong suốt quá trình chế tạo¹. Trong số các loại mực sinh học hiện nay, hydrogel nền gelatin-alginate (G-A) được sử dụng phổ biến nhờ vào các đặc tính sinh học vượt trội, bao gồm tính tương thích sinh học cao, khả năng tạo gel nhanh chóng và cơ chế liên kết ion linh hoạt, có thể điều chỉnh phù hợp với các điều kiện in khác nhau^{3,4}. Tuy nhiên, một trong những thách thức lớn khi sử dụng mực sinh học là sự thay đổi tính chất cơ học và khả năng in theo thời gian, đặc biệt là khi bảo quản trong các điều kiện nhiệt độ khác nhau. Trong thực tế, điều kiện bảo quản có thể ảnh hưởng đáng kể đến tính chất lưu biến (rheological properties), khả năng đùn (extrudability) và

độ ổn định cấu trúc của mực sinh học. Nếu mực sinh học bị suy giảm khả năng in sau thời gian bảo quản, có thể dẫn đến sai lệch về hình dạng, kích thước và độ chính xác của cấu trúc in, gây ảnh hưởng đến hiệu quả ứng dụng trong lĩnh vực y sinh. Do đó, việc đánh giá ảnh hưởng của điều kiện bảo quản đến khả năng in của mực sinh học là rất cần thiết để xác định điều kiện bảo quản tối ưu giúp duy trì chất lượng mực sinh học trong thời gian dài.

Bài báo trình bày cách đánh giá ảnh hưởng của ba điều kiện nhiệt độ bảo quản: nhiệt độ đông lạnh ($-20 \pm 1^\circ\text{C}$), nhiệt độ lạnh ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) và nhiệt độ phòng ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) đến khả năng in của mực sinh học gelatin-alginate (B-GA) trong thời gian 21 ngày. Các tiêu chí đánh giá bao gồm khả năng tạo sợi, chỉ số đồng dạng (U), độ hòa lẫn cấu trúc (Df) và khả năng in lỗ (Pr). Kết quả đạt được cung cấp thông tin quan trọng về ảnh hưởng của nhiệt độ bảo quản đến tính chất in của mực sinh học, từ đó đề xuất điều kiện nhiệt độ bảo quản tối ưu để duy trì khả năng in trong ứng dụng in 3D.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Trích dẫn bài báo này: Hiếu Nghĩa P T, Mai Trinh T T, Ngọc Quyển T, Bảo Hà T L. Ảnh hưởng của nhiệt độ bảo quản đến khả năng in của mực sinh học gelatin-alginate. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2025; x(x):xxxx-xxxx.

Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Chuẩn bị mực in gelatin-alginate

Mực sinh học gelatin-alginate (Gelatin-alginate bioink, -GA) được chuẩn bị với nồng độ cuối gồm 4% gelatin (w/v), 4% alginate (w/v) và 14 mM CaCl_2 . Các thành phần gồm gelatin loại B từ da bò (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ; Cat. No: G9391-500G; CAS: 9000-70-8) và sodium alginate từ tảo nâu (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ; Cat. No: 180947-250G; CAS: 9005-38-3) được hòa tan hoàn toàn trong nước cất hai lần trước khi phối trộn. Dung dịch CaCl_2 0,07 M (Merck, Đức; Cat. No: 1.03378.0500; CAS: 10043-52-4) được hấp khử trùng ở 121°C , 1 atm, sau đó được bổ sung vào hỗn hợp gelatin-alginate trước khi khuấy đều để tạo thành mực in.

Mực B-GA sau khi chuẩn bị được bảo quản ở ba điều kiện nhiệt độ khác nhau: đông lạnh ($-20 \pm 1^\circ\text{C}$), lạnh ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) và nhiệt độ phòng ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Mực in được đánh giá khả năng in tại các thời điểm bảo quản 0, 7, 14 và 21 ngày (ký hiệu D0, D7, D14, D21).

Đánh giá trạng thái mực in

Trạng thái của mực in được đánh giá bằng thử nghiệm úp ngược để xác định tính ổn định của trạng thái mực in, đảm bảo phù hợp cho quá trình in. Cụ thể, 2 mL mực B-GA được chuyển vào lọ hình trụ và đặt úp ngược theo phương thẳng đứng. Lọ chứa mực in này được làm từ vật liệu nhựa trong suốt, có đường kính trong 1,5 cm và chiều cao 5 cm. Ở các thời điểm khảo sát (D0, D7, D14, D21), mẫu mực sau khi bảo quản ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau được chuẩn bị như sau: mẫu bảo quản ở nhiệt độ phòng được sử dụng trực tiếp, mẫu bảo quản lạnh (4°C) được để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút để đạt nhiệt độ ổn định khoảng 25°C , mẫu bảo quản đông lạnh (-20°C) được rã đông và ổn định ở nhiệt độ phòng trong 30 phút để đạt nhiệt độ ổn định ($18,80 \pm 0,264^\circ\text{C}$) trước khi tiến hành đánh giá. Hình ảnh trạng thái mực được ghi nhận trong vòng 30 phút để quan sát sự thay đổi về độ chảy và trạng thái mực in. Độ chảy được đánh giá định tính thông qua quan sát thời gian bắt đầu di chuyển và mức độ dịch chuyển của mực in dưới tác dụng trọng lực, từ đó xác định mực in có khả năng chảy tự do, dính nhớt, vón cục hay không dịch chuyển.

Đánh giá khả năng tạo sợi

Khả năng tạo sợi của mực B-GA được đánh giá nhằm xác định tính khả thi của mực trong quá trình in ép đùn, vì việc tạo sợi ổn định là điều kiện tiên quyết để xây dựng cấu trúc in 3D. Sợi mực cần được kéo dài và giữ nguyên hình dạng để có thể tạo thành các lớp in liên tiếp, từ đó hình thành cấu trúc hoàn chỉnh.

Thí nghiệm được thực hiện bằng cách chứa mực B-GA trong ống mực 3 mL (BD PlastipakTM 3mL, Mỹ)

và đùn qua máy in sinh học 3D (BioX, CELLINK, Thụy Điển) để tạo sợi. Mỗi ống mực chỉ được sử dụng một lần duy nhất cho từng điều kiện thí nghiệm để tránh ảnh hưởng bởi sự thay đổi nhiệt độ lặp đi lặp lại và đảm bảo độ tin cậy của kết quả. Khả năng tạo sợi của mực B-GA được đánh giá ở các thời điểm D0, D7, D14 và D21 nhằm khảo sát sự thay đổi về tính chất mực trong suốt thời gian bảo quản.

Quá trình in được thực hiện trong điều kiện nhiệt độ phòng ổn định ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) và thời gian in mỗi ống mực không quá 5 phút. Trong quá trình đánh giá, đầu in được thiết lập là bơm xilanh 2,5 mL (syringe pump 2,5 mL), với tốc độ đùn $0,3 \mu\text{L}/\text{mm}$. Đầu vòi in sử dụng có đường kính trong 0,25 mm (nozzle 27G). Đối với thí nghiệm đánh giá khả năng tạo sợi, đầu in được giữ cố định (không di chuyển), nhằm khảo sát khả năng hình thành sợi liên tục khi đùn mực tại một điểm duy nhất. Các thông số này cũng được áp dụng cho các thí nghiệm đánh giá khả năng in đơn lớp, với sự khác biệt là đầu in trong trường hợp này được di chuyển ở tốc độ 5 mm/s.

Đánh giá khả năng in đơn lớp

Khả năng in đơn lớp của mực B-GA được đánh giá thông qua ba chỉ số chính: chỉ số đồng dạng (Uniformity factor, U), chỉ số hòa lẫn (Diffusion rate, Df) và chỉ số khả năng in lỗ (Pore printability, Pr). Các chỉ số này giúp xác định độ chính xác, khả năng kiểm soát hình dạng và sự ổn định của mực in trong quá trình in 3D.

Để xác định các chỉ số trên, các bản mô hình 3D bằng phần mềm SolidWorks, gồm mô hình đánh giá U (Hình 1A), Df (Hình 1B) và Pr (Hình 1C) đã được thiết kế. Các mô hình này được sử dụng làm đầu vào cho máy in sinh học, giúp tạo mẫu in theo thiết kế. Sau khi in, mẫu in được chụp ảnh và phân tích bằng phần mềm ImageJ. Do độ tương phản giữa nền và mực tương đối thấp, trong qui trình, không sử dụng các bước tự động, mà thực hiện đo thủ công bằng lệnh Straight Line, Polygon Selection và Freehand Selection kết hợp với Measure để xác định chiều dài, đường kính, diện tích và chu vi. Mỗi phép đo được lặp lại năm lần để giảm sai số thao tác. Các dữ liệu thu được sử dụng để tính toán các chỉ số U, Df và Pr, từ đó đánh giá khả năng in của mực.

Chỉ số U

Chỉ số U được sử dụng để đánh giá mức độ đồng đều của sợi mực in so với mô hình lý thuyết, được xác định theo công thức 1⁵:

$$U = \frac{Pa}{Pt} \quad (1)$$

Trong đó Pa là chu vi thực tế của sợi mực in, Pt là chu vi lý thuyết của mô hình thiết kế.

Khi $U = 1$, sợi mực in đồng nhất, không biến dạng. Nếu $U > 1$, sợi mực dài hơn lý thuyết, có thể bị gợn sóng hoặc méo do độ nhớt mực, tốc độ in hoặc điều kiện gel hóa. Ngược lại, nếu $U < 1$, sợi mực ngắn hơn, có thể do co ngót hoặc đứt gãy.

Chỉ số Df

Chỉ số Df phản ánh mức độ hợp nhất giữa các sợi mực in trong quá trình in 3D. Chỉ số này cho biết liệu các sợi mực có duy trì ranh giới rõ ràng hay bị dính vào nhau quá mức. Chỉ số Df được tính theo công thức 2⁶:

$$Df = \frac{At - Aa}{At} \times 100\% \quad (2)$$

Trong đó At là diện tích lỗ lý thuyết trong mô hình thiết kế, Aa là diện tích thực tế của lỗ in.

Giá trị Df cao cho thấy sợi mực dễ hòa lẫn hoặc mất cấu trúc, trong khi Df thấp phản ánh khả năng duy trì hình dạng ổn định với ranh giới sợi rõ ràng.

Chỉ số Pr

Chỉ số Pr đánh giá mức độ tái tạo chính xác của các lỗ in so với mô hình thiết kế, đồng thời phản ánh mức độ gel hóa của vật liệu in dựa trên hình dạng và kích thước lỗ in so với mô hình thiết kế. Chỉ số này phản ánh khả năng của mực B-GA trong việc duy trì các đặc điểm hình học nhỏ mà không bị biến dạng hoặc lấp đầy ngoài ý muốn. Chỉ số Pr được tính theo công thức 3²:

$$Pr = \frac{L^2}{16A} \quad (3)$$

Trong đó: Pr là chỉ số khả năng in lỗ, L là chu vi lỗ vuông trong cấu trúc in, A là diện tích lỗ vuông trong mô hình thiết kế.

Khi $Pr < 1$, vật liệu chưa gel hóa đủ khiến sợi in lan rộng và diện tích lỗ in thay đổi so với thiết kế ban đầu. Nếu $Pr = 1$, vật liệu đạt mức gel hóa phù hợp, giúp duy trì hình dạng lỗ in chính xác. Ngược lại, $Pr > 1$ cho thấy vật liệu bị gel hóa quá mức, gây gấp khúc và làm biến dạng lỗ in.

Xử lý số liệu và thống kê

Mỗi nghiệm thức được lặp lại ít nhất 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Dữ liệu thu được được xử lý bằng phần mềm GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Mỹ), trong đó các số liệu được phân tích bằng phương pháp ANOVA một chiều hoặc hai chiều (One-way ANOVA, Two-way ANOVA) nhằm xác định sự khác biệt giữa các nhóm. Kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p \leq 0,05$. Các biểu đồ trực quan hóa số liệu cũng được vẽ bằng phần mềm GraphPad Prism 9.

KẾT QUẢ

Kết quả đánh giá trạng thái mực in

Trước khi bảo quản, mực sinh học B-GA đã được gel hóa hoàn toàn và duy trì trạng thái ổn định trong suốt 30 phút quan sát, không có hiện tượng tách pha hay thay đổi hình dạng (Hình 2A). Sau 21 ngày bảo quản ở ba điều kiện nhiệt độ đông lạnh, lạnh và phòng, mực vẫn giữ được trạng thái ổn định trong thời gian dài (Hình 2B).

Kết quả đánh giá khả năng tạo sợi

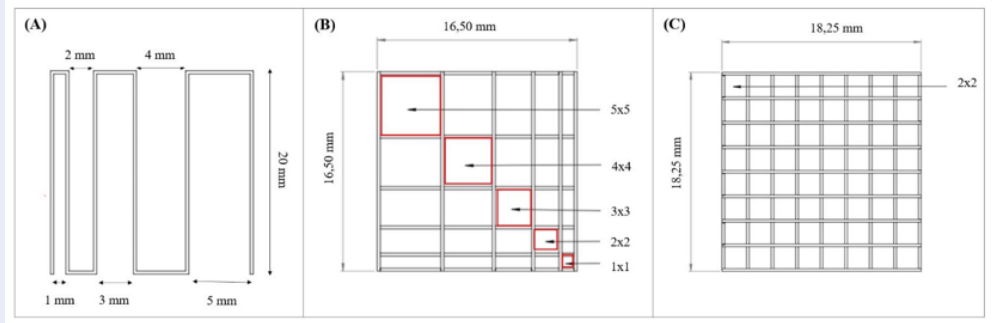
Trước khi bảo quản, mực B-GA có khả năng tạo sợi liên tục và duy trì hình dạng thẳng từ đầu vòi in đến bề mặt in, không bị đứt gãy hay biến dạng. Sau khi bảo quản ở các điều kiện nhiệt độ đông lạnh, lạnh và nhiệt độ phòng, mực vẫn duy trì khả năng tạo sợi ổn định tại các thời điểm D7, D14 và D21 (Hình 3). Các sợi in ra vẫn thẳng, không có dấu hiệu co rút hoặc đứt đoạn. Điều này cho thấy mực B-GA có khả năng bảo toàn tính chất in sợi trong suốt 21 ngày bảo quản.

Kết quả đánh giá khả năng in đơn lớp

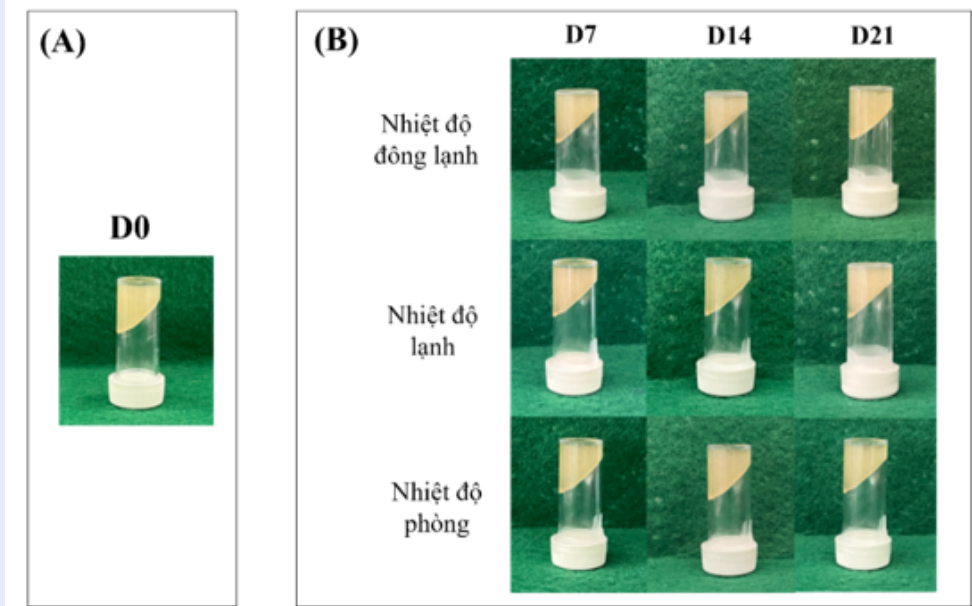
Đánh giá chỉ số U

Trước khi bảo quản, các sợi mực in từ mực sinh học B-GA có hình dạng đồng nhất, bề mặt mượt và không bị đứt quãng trong quá trình in (Hình 4A). Các sợi mực duy trì khoảng cách thiết kế, không có dấu hiệu hòa lẫn vào nhau ngay cả ở khoảng cách nhỏ nhất 1 mm. Giá trị chỉ số đồng dạng trước bảo quản được ghi nhận là $U = 1,0047 \pm 0,0481$, cho thấy sợi mực in có độ ổn định cao về mặt hình dạng. Sau thời gian bảo quản, hình dạng sợi mực vẫn được duy trì ở cả ba điều kiện nhiệt độ khảo sát (Hình 4B). Tuy nhiên, ở nhiệt độ phòng vào ngày D21, xuất hiện hiện tượng sợi mực ở khoảng cách 1 mm có xu hướng hòa lẫn nhẹ tại vị trí giao nhau. Điều này cho thấy khả năng kiểm soát hình dạng của mực có thể bị ảnh hưởng theo thời gian bảo quản, đặc biệt ở nhiệt độ cao hơn.

Kết quả phân tích định lượng (Hình 5) cho thấy chỉ số đồng dạng U có xu hướng giảm theo thời gian ở tất cả các điều kiện bảo quản, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Ở điều kiện đông lạnh ($-20 \pm 1^\circ\text{C}$), giá trị U giảm từ $1,0047 \pm 0,0481$ (D0) xuống $0,9878 \pm 0,02715$ (D7), tiếp tục giảm xuống $0,9486 \pm 0,02221$ (D14) và $0,9501 \pm 0,01181$ (D21). Ở nhiệt độ lạnh ($4 \pm 1^\circ\text{C}$), chỉ số U thay đổi từ $1,0047 \pm 0,0481$ (D0) xuống $0,9942 \pm 0,00558$ (D7), $0,9899 \pm 0,02027$ (D14) và $0,9818 \pm 0,01515$ (D21). Ở nhiệt độ phòng ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), chỉ số U thay đổi từ $1,0047 \pm 0,0481$ (D0) xuống $0,9935 \pm 0,01573$ (D7), $0,9744 \pm 0,01852$ (D14) và $0,9445 \pm 0,03181$ (D21).



Hình 1: Mô hình thiết kế 3D đánh giá các chỉ số U, Df, Pr. A: Mô hình đánh giá chỉ số U; B: Mô hình đánh giá chỉ số Df; C: Mô hình đánh giá chỉ số Pr.



Hình 2: Trạng thái mực in B-GA trước và sau khi bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau. A: Trạng thái mực in trước khi bảo quản (D0); B: Trạng thái mực in sau khi bảo quản (D7,D14, D21).

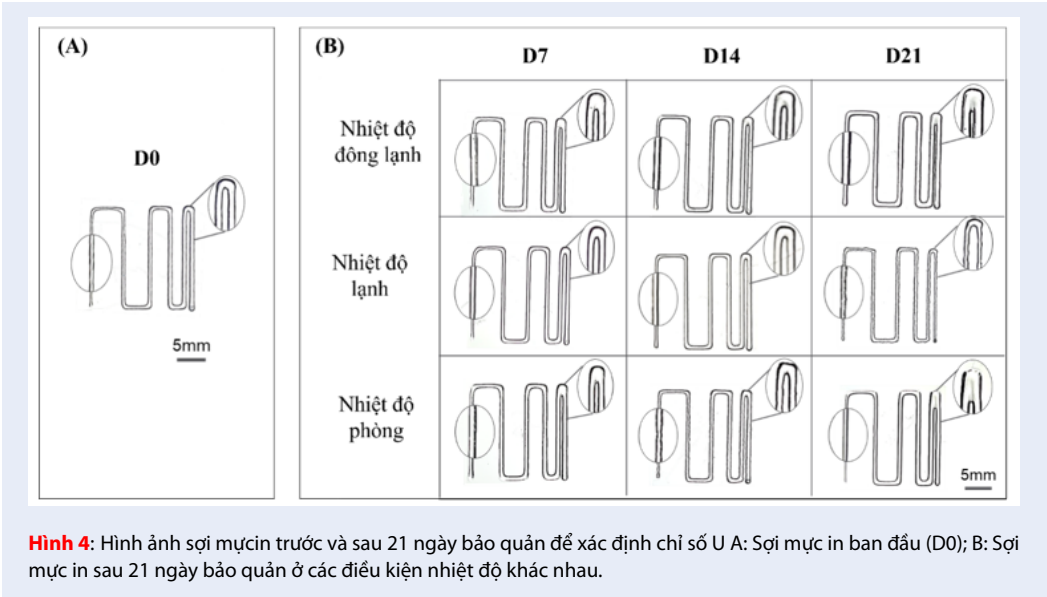
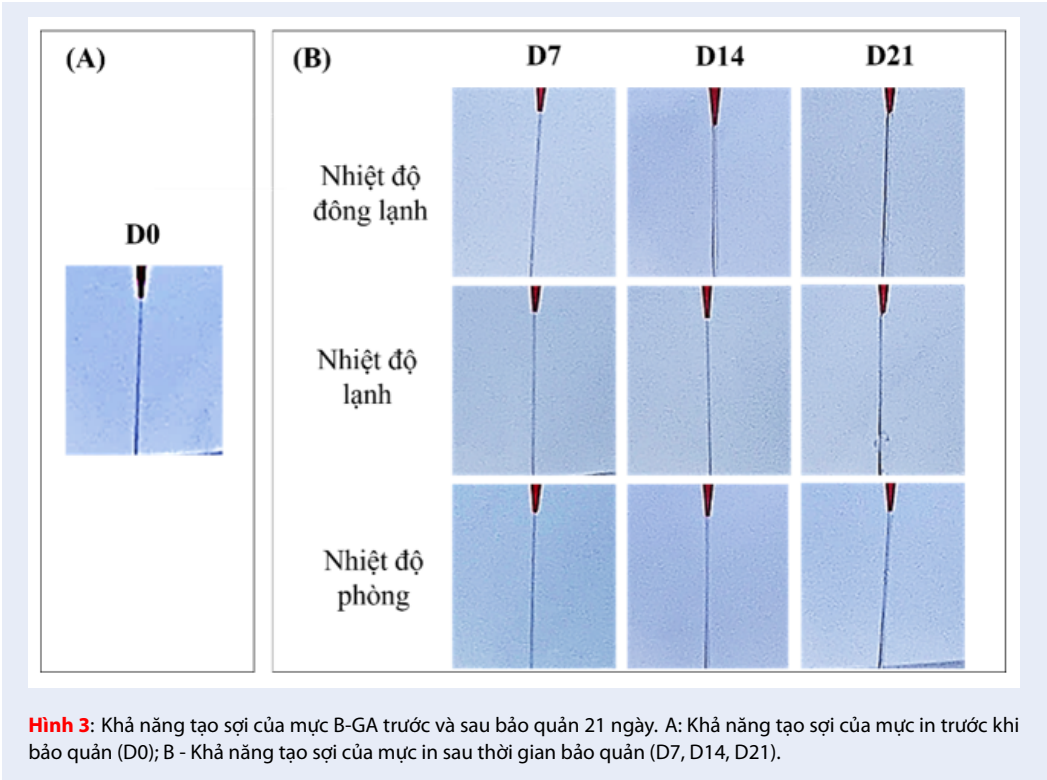
Kết quả đánh giá chỉ số U cho thấy mực sinh học B-GA có khả năng duy trì độ đồng dạng của sợi mực in trong suốt quá trình bảo quản ở tất cả các điều kiện nhiệt độ khảo sát. Dù chỉ số U có xu hướng giảm dần theo thời gian, nhưng sự biến thiên này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), điều này cho thấy độ ổn định tương đối của mực trong điều kiện bảo quản khác nhau.

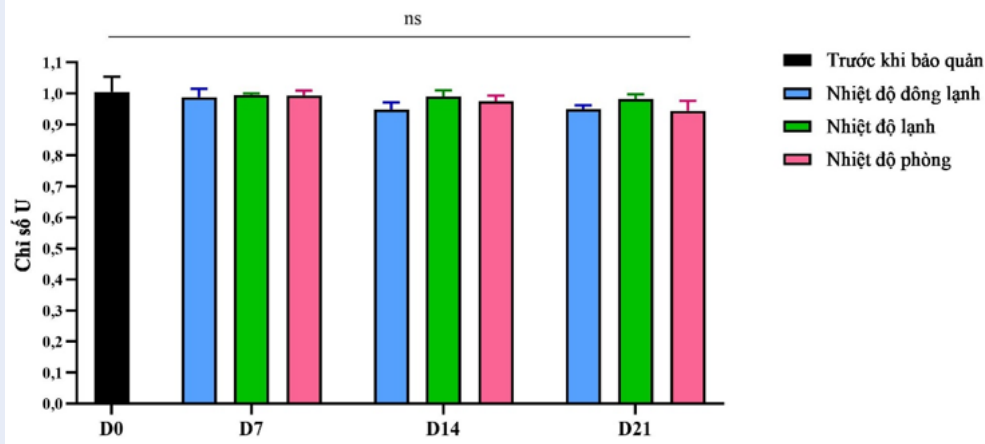
Đánh giá chỉ số Df

Trước khi bảo quản, giá trị Df có xu hướng tăng khi kích thước lỗ in giảm. Cụ thể, với kích thước lỗ 5 mm $\times$ 5 mm, Df là 11, 1387 $\pm$ 5,5659%, trong khi ở lỗ

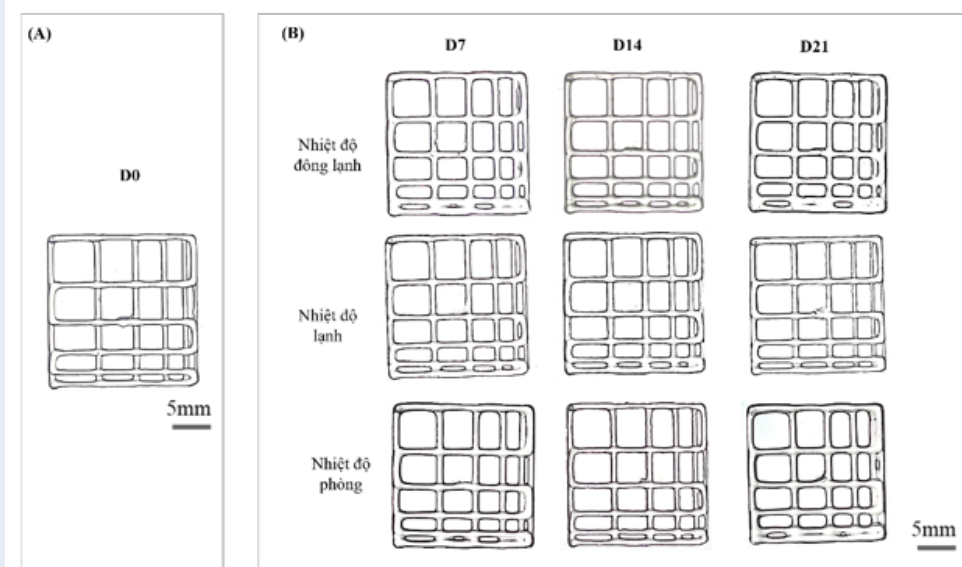
2 mm $\times$ 2 mm và 1 mm $\times$ 1 mm, giá trị này tăng lên lần lượt 26,3750 $\pm$ 5,4443% và 93,4667 $\pm$ 4,9863% (Hình 6 và 7A), cho thấy mức độ biến dạng của các lỗ nhỏ cao hơn so với lỗ lớn.

Sau quá trình bảo quản, chỉ số Df có sự thay đổi khác nhau tùy theo điều kiện nhiệt độ (Hình 7B, C, D). Ở nhiệt độ đông lạnh, Df tăng theo thời gian bảo quản, đặc biệt rõ ràng ở các lỗ có kích thước nhỏ. Sau 21 ngày, giá trị Df của lỗ 5 mm $\times$ 5 mm tăng lên 25,1333 $\pm$ 4,9456%, lỗ 2 mm $\times$ 2 mm tăng lên 52,1333 $\pm$ 3,4316%, trong khi lỗ 1 mm $\times$ 1 mm gần như bị hòa lẫn hoàn toàn với Df đạt 99,1333 $\pm$ 0,7572%. Ở nhiệt độ lạnh, sự thay đổi Df theo thời gian ít hơn so với





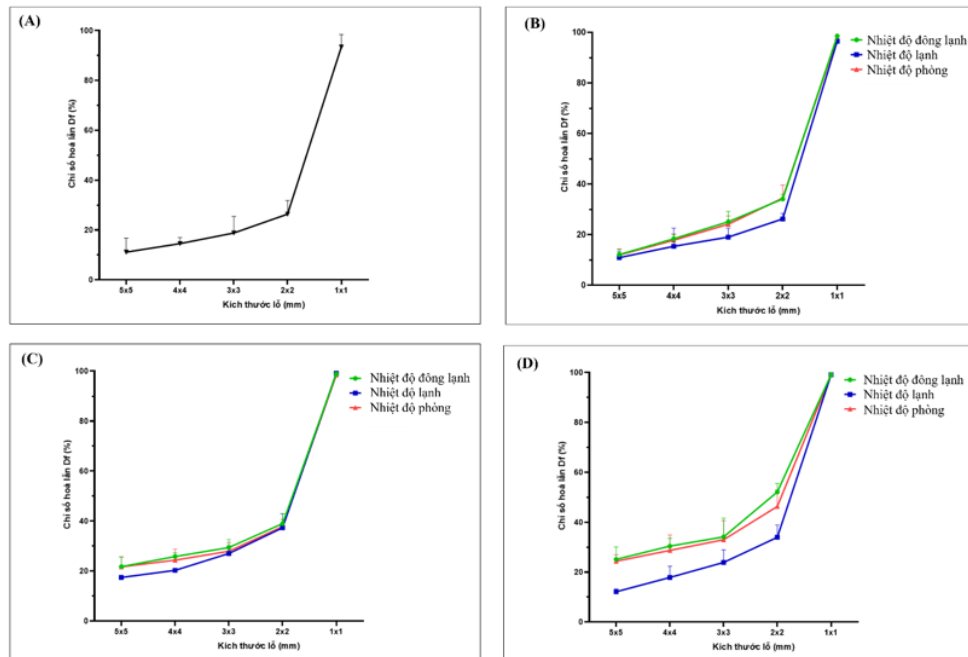
Hình 5: Biểu đồ so sánh chỉ số U trước và sau bảo quản ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau. ns: $p > 0,05$.



Hình 6: Hình ảnh cấu trúc in theo mô hình đánh giá Df trước và sau bảo quản. A: Trước khi bảo quản (D0); B: Sau thời gian bảo quản (D7, D14, D21).

điều kiện đông lạnh. Giá trị Df của hầu hết các kích thước lỗ chỉ dao động nhẹ; tuy nhiên, lỗ $2\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ và $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ vẫn ghi nhận mức tăng, đạt lần lượt $33,9500 \pm 4,9672\%$ và $99,1333 \pm 0,6110\%$ vào ngày thứ 21. Trong điều kiện nhiệt độ phòng, Df cũng tăng dần theo thời gian bảo quản. Sau 21 ngày, giá trị Df của lỗ $2\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ đạt $46,3250 \pm 6,6298\%$, cao hơn so với nhiệt độ lạnh, trong khi lỗ $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ gần như bị hòa lẫn hoàn toàn với Df đạt $99,1000 \pm 0,9000\%$.

Nhìn chung, dữ liệu cho thấy các lỗ in nhỏ ($2\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ và $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$) có giá trị Df cao ngay từ ban đầu và tiếp tục tăng theo thời gian bảo quản. Điều kiện nhiệt độ bảo quản có ảnh hưởng đến mức độ ổn định hình học của lỗ in, trong đó mẫu bảo quản ở nhiệt độ đông lạnh và nhiệt độ phòng có mức tăng Df lớn hơn, phản ánh khả năng hòa lẫn giữa các sợi mực cao hơn. Ngược lại, mẫu bảo quản ở nhiệt độ lạnh duy trì giá trị Df thấp hơn trong suốt thời gian theo dõi, gợi ý khả năng bảo tồn hình dạng lỗ in tốt hơn so với hai điều kiện còn lại.



Hình 7: Biểu đồ so sánh chỉ số hòa lẫn (Df) trước và sau bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau. A: Trước bảo quản; B: Bảo quản 7 ngày; C: Bảo quản 14 ngày; D: Bảo quản 21 ngày.

Đánh giá chỉ số Pr

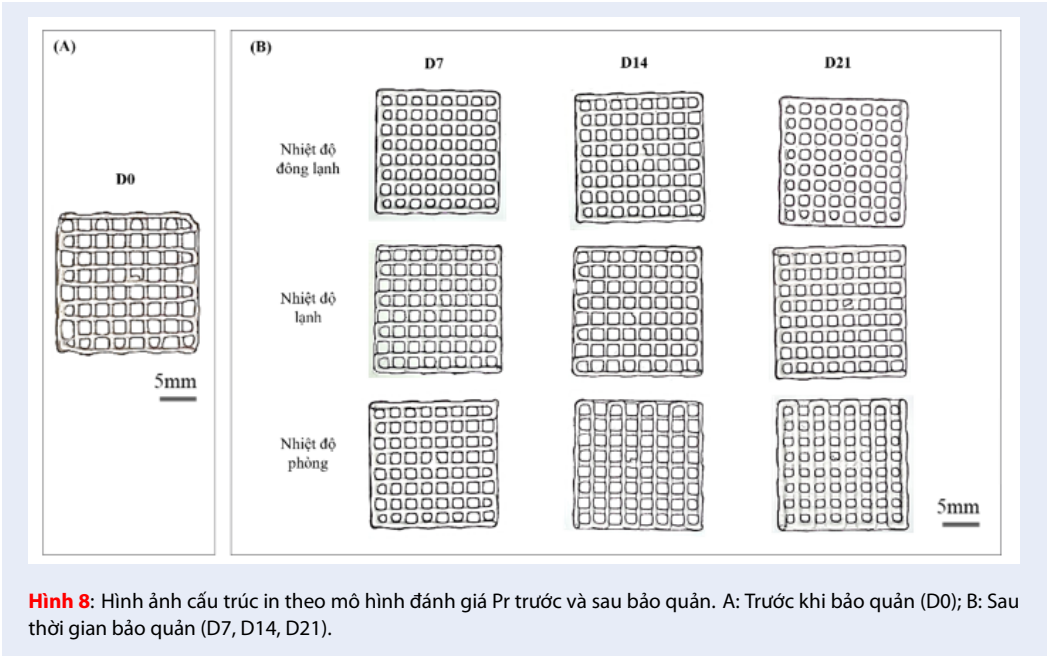
Trước khi bảo quản, cấu trúc in từ mực B-GA có hình dạng tương đồng với thiết kế mô hình Pr với các lỗ in phân định rõ và không có hiện tượng hòa lẫn giữa các sợi mực (Hình 8A). Sau thời gian bảo quản, các lỗ in vẫn được duy trì ở cả ba điều kiện nhiệt độ, tuy nhiên có sự khác biệt về mức độ ổn định hình dạng (Hình 8B). Cụ thể, ở nhiệt độ lạnh, hình dạng tổng thể được bảo toàn tương đối tốt so với thời điểm ban đầu. Ở nhóm bảo quản đông lạnh, cấu trúc có biến đổi nhẹ, trong khi ở điều kiện nhiệt độ phòng, cấu trúc in có xu hướng tròn hơn vào ngày D21 thay vì giữ được các góc cạnh như thiết kế ban đầu.

Kết quả phân tích định lượng chỉ số Pr được trình bày trong Hình 9. Tại thời điểm trước bảo quản, chỉ số Pr trung bình là $1,003 \pm 0,0012$. Ở điều kiện bảo quản đông lạnh, chỉ số Pr giảm còn $0,9196 \pm 0,0125$ tại D7, $0,925 \pm 0,9008$ tại D14, và $0,8469 \pm 0,0056$ tại D21. So với D0, mức giảm tại D21 là 0,1561 đơn vị, tương đương 15,6%. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại D7 ($p \leq 0,05$) và rất có ý nghĩa tại D21 ($p \leq 0,001$). Ở điều kiện bảo quản lạnh, chỉ số Pr duy trì ổn định qua các thời điểm với giá trị Pr là $1,002 \pm 0,0002$ ở D7, $0,986 \pm 0,0152$ ở D14 và $0,908 \pm 0,0227$ ở D21, không ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các thời điểm này so với D0 ($p > 0,05$). Ở điều kiện bảo quản tại nhiệt độ phòng, chỉ số Pr giảm dần từ 0,967

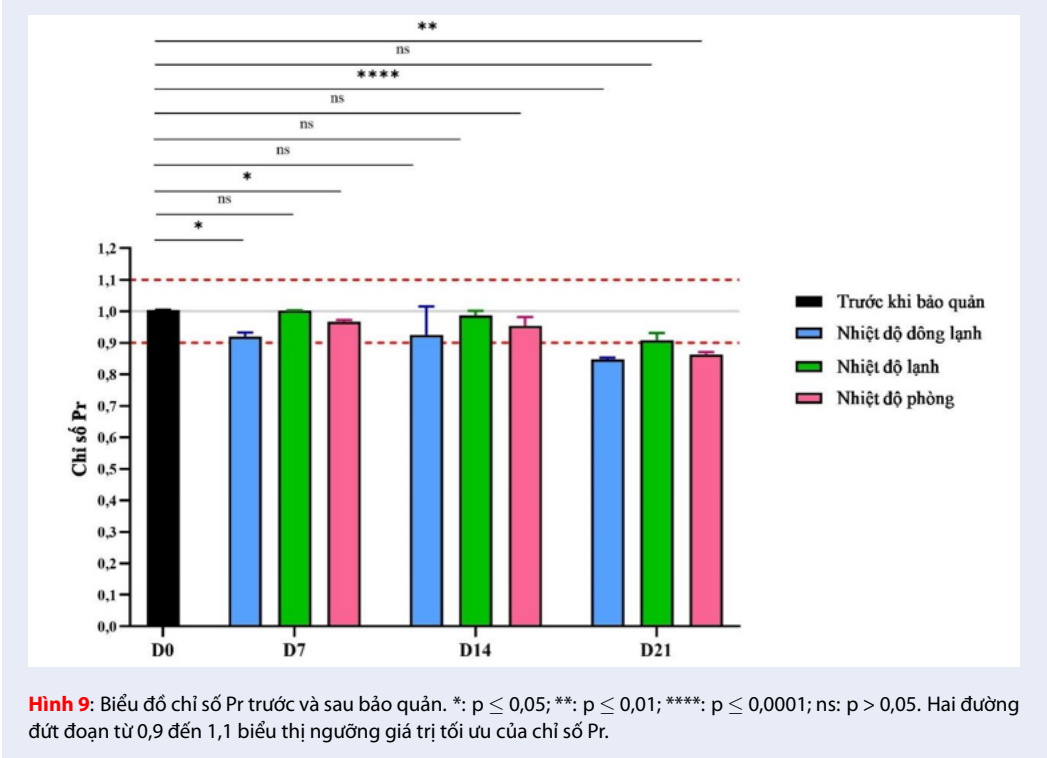
$\pm 0,0054$ (D7) đến $0,953 \pm 0,0282$ (D14) và $0,8630 \pm 0,0074$ tại D21. So với D0, giá trị tại D21 giảm 0,140 đơn vị, tương đương 13,9%. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại D7 ($p < 0,05$) và D21 ($p < 0,01$). Tổng hợp kết quả cho thấy chỉ số Pr giảm theo thời gian ở điều kiện đông lạnh và nhiệt độ phòng, với mức giảm rõ nhất ở nhóm đông lạnh. Trong khi đó, ở điều kiện lạnh, chỉ số Pr không có sự thay đổi đáng kể trong suốt thời gian bảo quản.

THẢO LUẬN

Nhiệt độ và thời gian bảo quản là hai yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tính chất của mực sinh học B-GA. Gelatin, thành phần chính của mực B-GA, là một hydrogel nhạy nhiệt, có quá trình gel hóa phụ thuộc vào nhiệt độ⁷. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng độ đàn hồi của gel giảm khi nhiệt độ tăng và cấu trúc gel bền vững hơn ở nhiệt độ thấp hơn⁸. Trạng thái gel ổn định giúp mực in duy trì khả năng tạo sợi và đảm bảo độ chính xác của cấu trúc in theo thời gian. Bên cạnh yếu tố nhiệt độ, bản chất của vật liệu sinh học cũng đóng vai trò quan trọng trong tính ổn định của mực in. Gelatin và alginate hình thành cấu trúc gel thông qua các liên kết hydro và liên kết ion với cation Ca^{2+} ^{7,9}. Do đặc tính hydrogel, những vật liệu này chứa một lượng nước đáng kể trong cấu trúc, làm tăng nguy cơ phá vỡ liên kết nếu điều kiện bảo quản



Hình 8: Hình ảnh cấu trúc in theo mô hình đánh giá Pr trước và sau bảo quản. A: Trước khi bảo quản (D0); B: Sau thời gian bảo quản (D7, D14, D21).



Hình 9: Biểu đồ chỉ số Pr trước và sau bảo quản. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ****: $p \leq 0,0001$; ns: $p > 0,05$. Hai đường đứt đoạn từ 0,9 đến 1,1 biểu thị ngưỡng giá trị tối ưu của chỉ số Pr.

hoặc môi trường in không phù hợp. Khi các liên kết bị suy yếu, tính ổn định của mực giảm, dẫn đến sự gia tăng chỉ số Df và làm ảnh hưởng đến độ chính xác của cấu trúc in. Ngược lại, nếu liên kết gel được duy trì tốt, chỉ số Df giữ ở mức thấp, giúp mực in tái tạo hình dạng mong muốn một cách chính xác hơn.

Khi bảo quản ở nhiệt độ lạnh ($4 \pm 1^\circ\text{C}$), chỉ số Df ít biến đổi theo thời gian, giúp duy trì hình dạng ban đầu của lỗ in. Sau 21 ngày bảo quản, giá trị Pr vẫn nằm trong khoảng tối ưu ($\text{Pr} = 0,908 \pm 0,0227$), chứng tỏ mực in vẫn giữ được khả năng tạo cấu trúc ổn định. Ngoài ra, khả năng duy trì liên kết trong mực tốt hơn so với các điều kiện khác giúp giảm hiện tượng hòa lẫn giữa các sợi mực, đảm bảo tính chính xác của cấu trúc in theo thời gian. Ngược lại, khi bảo quản ở nhiệt độ phòng, chỉ số Df có xu hướng tăng nhanh hơn, đặc biệt ở các lỗ in nhỏ. Khi thời gian bảo quản kéo dài, liên kết phân tử trong mực bị suy giảm, làm giảm khả năng chống chịu trọng lực, dẫn đến sự lan rộng của mực sau in. Vậy, sau 21 ngày, cấu trúc in có xu hướng mất ổn định, các đường mực hòa lẫn tại các điểm giao nhau, khiến mẫu in kém tương đồng với mô hình thiết kế ban đầu. Trong khi đó, ở điều kiện đông lạnh, mặc dù mực vẫn duy trì trạng thái gel, chỉ số Df vẫn tăng theo thời gian. Quan sát trực tiếp sau khi lấy mẫu khỏi tủ đông cho thấy sự xuất hiện của tinh thể băng trong khối mực, có thể liên quan đến hiện tượng đóng băng nước tự do trong cấu trúc hydrogel. Điều này có thể liên quan đến sự thay đổi vi cấu trúc trong quá trình đóng băng và rã đông. Khi đông lạnh kéo dài, sự hình thành tinh thể băng làm suy giảm một số liên kết hydro và liên kết ion trong gel, gây tái sắp xếp lại các chuỗi polyme và làm giảm độ nhớt của mực¹⁰. Hệ quả là cấu trúc trở nên kém ổn định hơn, dẫn đến sự lan rộng của mực sau in, làm tăng giá trị Df và ảnh hưởng đến độ chính xác của sản phẩm in 3D. Nhìn chung, so sánh giữa ba điều kiện bảo quản cho thấy nhiệt độ lạnh ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) là lựa chọn tối ưu nhất, giúp duy trì tốt nhất tính chất của mực sinh học B-GA. Ở điều kiện này, chỉ số Df thấp nhất và cấu trúc in giữ nguyên hình dạng so với thiết kế ban đầu trong suốt 21 ngày bảo quản. Ngược lại, bảo quản ở nhiệt độ phòng hoặc đông lạnh đều dẫn đến sự suy giảm chất lượng của mực, làm giảm độ chính xác của cấu trúc in.

Như vậy, đã xác định được điều kiện nhiệt độ bảo quản tối ưu, tuy nhiên vẫn tồn tại một số hạn chế. Thứ nhất, thời gian theo dõi giới hạn trong 21 ngày chưa cho phép đánh giá khả năng bảo quản dài hạn của mực B-GA. Cần có các nghiên cứu tiếp theo mở rộng thời gian đánh giá để xác định khả năng duy trì

chất lượng mực trong thời gian dài hơn. Thứ hai, chưa phân tích cơ chế gây suy giảm khả năng in và các thay đổi tính chất lưu biến, độ nhớt, tương tác thành phần trong quá trình bảo quản. Ngoài ra, cũng cần kiểm tra khả năng duy trì tính tương thích sinh học và hỗ trợ tế bào của mực sau bảo quản để đảm bảo ứng dụng hiệu quả trong in 3D.

KẾT LUẬN

Mực in B-GA có thể duy trì khả năng in sau khi được bảo quản ba điều kiện nhiệt độ khác nhau trong một khoảng thời gian nhất định. Ở nhiệt độ phòng ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) và nhiệt độ đông lạnh ($-20 \pm 1^\circ\text{C}$), các chỉ số liên quan đến khả năng in của mực B-GA (U, Df, Pr) được duy trì tốt trong 14 ngày đầu, tuy nhiên có sự suy giảm nhất định về hình dạng sợi mực in sau 21 ngày. Ngược lại, ở điều kiện bảo quản lạnh ($4 \pm 1^\circ\text{C}$), mực in B-GA có thể duy trì trạng thái ổn định đến 21 ngày, với các chỉ số về khả năng in U, Df không thay đổi đáng kể và chỉ số Pr không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với thời điểm trước bảo quản ($\text{Pr} = 0,908 \pm 0,0227$). Kết quả này cho thấy nhiệt độ bảo quản lạnh ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) là điều kiện bảo quản phù hợp để kéo dài thời gian sử dụng của mực B-GA lên đến 21 ngày mà không ảnh hưởng đến khả năng in.

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

3D (three-dimension): ba chiều

-GA: mực sinh học gelatin-alginate

Df (Diffusion rate): chỉ số độ hoà lẫn

Pr (Pore Printability): chỉ số khả năng in lỗ

U (Uniformity): chỉ số đồng dạng

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) trong khuôn khổ Đề tài mã số B2023-18-09.

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Nhóm tác giả đồng ý rằng không có bất kỳ xung đột lợi ích nào liên quan đến các kết quả đã công bố trong bài báo.

ĐÓNG GÓP CỦA TÁC GIẢ

Phan Thị Hiếu Nghĩa đưa ra ý tưởng nghiên cứu, lập kế hoạch nghiên cứu, thực hiện thí nghiệm, viết và chỉnh sửa bản thảo. Trần Thị Mai Trinh thực hiện thí nghiệm, thu thập và xử lý dữ liệu. Trần Ngọc Quyển đóng góp ý kiến, nhận xét và chỉnh sửa bản thảo. Trần Lê Bảo Hà định hướng nghiên cứu, đưa ra góp ý chuyên môn, rà soát và chỉnh sửa bản thảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gungor-Ozkerim PS, Inci I, Zhang YS, Khademhosseini A, Dokmeci MR. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomaterials Science*. 2018;6(5):915–46. Available from: <https://doi.org/10.1039/C7BM00765E>.
2. Cui H, Nowicki M, Fisher JP, Zhang LG. 3D bioprinting for organ regeneration. *Advanced Healthcare Materials*. 2017;6(1). Available from: <https://doi.org/10.1002/adhm.201601118>.
3. Ma Y, Wang Y, Chen D, Su T, Chang Q, Huang W, et al. 3D bioprinting of a gradient stiffened gelatin-alginate hydrogel with adipose-derived stem cells for full-thickness skin regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*. 2023;11(13):2989–3000. Available from: <https://doi.org/10.1039/D2TB02200A>.
4. Fayyazbakhsh F, Khayat MJ, Leu MC. 3D-printed gelatin-alginate hydrogel dressings for burn wound healing: A comprehensive study. *International Journal of Bioprinting*. 2022;8(4):618. Available from: <https://doi.org/10.18063/ijb.v8i4.618>.
5. Soltan N, Ning L, Mohabatpour F, Papagerakis P, Chen X. Printability and cell viability in bioprinting alginate dialdehyde-gelatin scaffolds. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2019;5(6):2976–87. Available from: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00167>.
6. Habib MA, Khoda B. Development of clay based novel bio-ink for 3D bio-printing process. *Procedia Manufacturing*. 2018;26:846–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2018.07.105>.
7. Kokol V, Pottathara YB, MihelM, Perše LSJC, Physicochemical SA, Aspects E. Rheological properties of gelatine hydrogels affected by flow-and horizontally-induced cooling rates during 3D cryo-printing. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2021;616:126356. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126356>.
8. Huang H, Li K, Hou J, Shen C. A study of the temperature-dependent stress yielding behavior of a gelatin-based hydrogel ink and its effects on the enhancement of the 3D printing resolution. *Polymer Testing*. 2024;137. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2024.108501>.
9. Malektaj H, Drozdov AD, deClaville Christiansen J. Mechanical properties of alginate hydrogels cross-linked with multivalent cations. *Polymers*. 2023;15(14):3012. Available from: <https://doi.org/10.3390/polym15143012>.
10. Sever M, Škrinjar D, Maver T, Belak M, ZupaniF, Anl, et al. The impact of temperature and the duration of freezing on a hydrogel used for a 3D-bioprinted in vitro skin model. *Biomedicines*. 2024;12(9):2028. Available from: <https://doi.org/10.3390/biomedicines12092028>.

Effect of storage temperature on the printability of the gelatin-alginate bioink

Phan Thi Hieu Nghia^{1,2,3,*}, Tran Thi Mai Trinh^{2,3}, Tran Ngoc Quyen⁴, Tran Le Bao Ha^{1,2,3}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

¹Laboratory of Tissue Engineering and Biomedical Materials, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Department of Animal Physiology and Biotechnology, Faculty of Biology - Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴Institute for Applied Materials Science, Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

Correspondence

Phan Thi Hieu Nghia, Laboratory of Tissue Engineering and Biomedical Materials, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam

Department of Animal Physiology and Biotechnology, Faculty of Biology - Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam

Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam

Email: phtnghia@hcmus.edu.vn

History

- Received: 14-3-2025
- Revised: 06-8-2025
- Accepted: 05-11-2025
- Published Online: xx-xx-xxxx

DOI :



Copyright

© VNUHCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



ABSTRACT

Bioink is a fundamental component of three-dimensional (3D) printing technology, exerting a direct influence on the overall quality, precision, and structural integrity of printed biological constructs. Among various factors influencing printing outcomes, printability is a key determinant for success, as it impacts the precision of printed structures, the consistency of filament formation, and the ability to maintain the correct shape throughout the printing process. The printability of bioink is influenced not only by its composition but also by external conditions, particularly the storage temperature. Therefore, evaluating the impact of storage temperature on bioink printability is essential. This paper presents the evaluation of the effects of three different storage temperature conditions on the printability of gelatin-alginate B-GA bioink over a period of 21 days. These conditions included freezing at $-20 \pm 1^\circ\text{C}$, refrigeration at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ and storage at room temperature of $25 \pm 2^\circ\text{C}$. The printability was assessed by examining various parameters, including the state of the bioink, the ability to form continuous filaments, the uniformity factor (U), the diffusion rate (Df) and the effectiveness of pore formation (Pr). The results showed that the printability of B-GA bioink remained stable during the first 14 days under all three tested storage conditions. However, after 21 days, a significant decline in printability was observed in the cases of freezing and room temperature conditions, proven by the decrease in Pr values of 0.8469 ± 0.0056 and 0.8630 ± 0.0074 , respectively. In contrast, refrigeration at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ allowed the B-GA bioink to retain its printability consistently throughout the entire 21-day period, with a Pr value of 0.908 ± 0.0227 . Therefore, in the test, storing B-GA bioink at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ was the most effective condition for preserving its printability over 21 days.

Key words: 3D printing, bioink, gelatin-alginate, printability, storage

Cite this article : Hieu Nghia P T, Mai Trinh T T, Ngoc Quyen T, Bao Ha T L. **Effect of storage temperature on the printability of the gelatin- alginate bioink.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2025; x(x):xxxx-xxxx.