**Nanoinkapsulacija BMK**

**Cilj:** nanoinkapsulacija odabranih probiotičkih sojeva, producenata egzopolisaharida i S-proteina, kao i njihovih purificiranih terapijskih biomolekula, „layer by layer“ metodom, primjenom otopine polielektrolita koja će sadržavati poli (dialil-dimetil-amonij klorid) (PDDA; kationski polielektrolit) i natrijev polistiren sulfonat (PSS; anionski polielektrolit); liofilizacija nanokapsula i ispitivanje njihove stabilnosti tijekom prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta (GIT)

**Princip:** stanice BMK su negativno nabijene pa nanoinkapsulacija započinje dodatkom kationskog polielektrolita (PDDA), a zatim anionskog (PSS)

**Literatura:** Franz i sur. (2010)

**Radni mikroorganizmi:** *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te *L. fermentum* MC1 i D12

**Potrebno**

- 6 x 50 mL MRS bujona (za svaku BMK)

- 6 x 250 mL MRS bujona (za svaku BMK)

- 0,5 L PSS (2 mg/mL)

- 0,5 L PDDA (2 mg/mL)

- 10 x 300 mL destilirane vode

- 100 mL obranog mlijeka (10 %)

- sterilne Falconice (15 i 50 mL)

- sterilni tipsevi

- sterilne pencilinike i čepovi

- 50 MRS agar ploča

**Nanoinkapsulacija**

**22.01.2023.**

**-** sojeve *L. fermentum* MC1 i D12 te *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 precijepiti u 50 mL svježeg MRS bujona i staviti na anaerobnu prekonoćnu inkubaciju na 37 °C

**23.01.2023.**

**-** sojeve *L. fermentum* MC1 i D12 te *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 precijepiti u 250 mL svježeg MRS bujona i staviti na anaerobnu prekonoćnu inkubaciju na 37 °C

**24.01.2023.**

- 300 mL prekonoćne kulture BMK sojeva centrifugirati (4200 o/min, 5 min), stanice isprati s 25 mL sterilne deionizirane vode

- uzeti uzorak za mjerenje zeta potencijala (uzeti 100 µL; 20 µL uzorka pomiješati s 2 mL destilirane vode i izmjeriti zeta potencijal; IRB, Tanja Jurkin)

- 10 mL uzorka odvojiti da imamo kontrolu (slobodne stanice)

- centrifugirati (4200 o/min, 5 min) i stanice (talog) resuspedirati s 15 mL pozitivno nabijene otopine polimera (PDDA; 2 mg/mL) te inkubirati 10 min

- suspenziju centrifugirati i talog stanica isprati 2 puta sa sterilnom deioniziranom vodom (15 mL)

- uzeti uzorak za mjerenje zeta potencijala (uzeti 100 µL; 20 µL uzorka pomiješati s 2 mL destilirane vode i izmjeriti zeta potencijal)

- centrifugirati (4200 o/min) i stanice resuspedirati s 15 mL negativno nabijene otopine polimera (PSS; 2 mg/mL) te inkubirati 10 min

- suspenziju centrifugirati i talog stanica isprati 2 puta s deioniziranom vodom → PRVI SLOJ

- uzeti uzorak za mjerenje zeta potencijala (uzeti 100 µL; 20 µL uzorka pomiješati s 2 mL destilirane vode i izmjeriti zeta potencijal)

- postupak ponoviti do željenog broja slojeva → 3 SLOJA!

- konačno, dobije se 15 mL nanoinkapsuliranih (3 sloja) i 10 mL slobodnih stanica (kontrola)

- napraviti razrjeđenja i odrediti CFU/mL nanoinkapsuliranih i slobodnih stanica (do 108 raz.)

**26.01.2023.**

- izvaditi ploče iz inkubatora i prebrojati kolonije

**Liofilizacija**

**24.01.2023.**

- po 1 mL slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica centrifugirati i resuspendirati u 1 mL obranog mlijeka (za 1 mjesec te za liofilizaciju, ŽS i GIT) → centrifugirati 5 mL slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica i talog resuspendirati u 5 mL obranog mlijeka pa onda rasporediti u penicilinke

- zamrznuti i liofilizirati

**27.01.2023.**

- penicilinke označenu s „liofilizacija“ resuspendirati u 1 mL destilirane vode → napraviti razrjeđenja i odrediti CFU/mL nanoinkapsuliranih i slobodnih stanica nakon liofilizacije (do 108 raz.)

**29.01.2023.**

- izvaditi ploče iz inkubatora i prebrojati kolonije

**Preživljavanje u simuliranim uvjetima GIT-a (nakon liofilizacije)**

**27.01.2023.**

- u penicilinke s oznakama „ŽS“ i „GIT“ dodati 3 mL simuliranog želučanog soka, inkubirati 2h pri 37 °C

- nakon 2h sve prebaciti u Falconice od 15 ml

- uzorke ŽS centrifugirati (4200 o/min, 5 min) i talog isprati u destiliranoj vodi (1 mL) dva puta → ovaj uzorak koristiti za određivanje CFU/mL nakon inkubacije u simuliranom želučanom soku (napraviti razrjeđenja do 107 i nacijepiti po dvije kapi od 10 µL na MRS ploče)

- uzorke GIT centrifugirati (4200 o/min, 5 min) i talog resuspendirati u 3 ml simuliranog soka tankog crijeva, inkubirati 4h pri 37 °C; nakon 4h uzorke centrifugirati (4200 o/min, 5 min) i isprati u destiliranoj vodi (1 mL) dva puta → ovaj uzorak koristiti za određivanje CFU/mL nakon inkubacije u simuliranom želučanom soku (napraviti razrjeđenja do 107 i nacijepiti po dvije kapi od 10 µL na MRS ploče)

**29.01.2023.**

- izvaditi ploče iz inkubatora i prebrojati kolonije

**Ispitivanje broja živih stanica u mikroinkapsuliranim i liofiliziranim (u obranom mlijeku) uzorcima nakon 1 mjesec**

**24.02.2023.**

- u penicilinku s liofiliziranim nanoinkapsuliranim sojevima BMK (oznaka 1 mjesec) dodati 1 mL dodati sterilnu destiliranu vodu i resuspendirati → napraviti razrjeđenja i odrediti CFU/mL nanoinkapsuliranih i slobodnih stanica nakon liofilizacije (do 108 raz.)

**26.02.2023.**

- izvaditi ploče iz inkubatora i prebrojati kolonije