**Mikroinkapsulacija BMK u alginatu uz dodatak FOS-a (plus kontrola)**

**Cilj:** mikroinkapsulacija sinbiotičkih pripravaka odabranih sojeva BMK, producenata S-proteina i EPS-a, u kombinaciji s prebiotičkim supstratima; ispitivanje sposobnosti preživljavanja liofilizacije i ispitivanje stabilnosti tijekom prolaska kroz simulirane uvjete GIT-a

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

**- u 2 paralele:**

1. kontrola (bez dodatka prebiotika)
2. FOS

**Potrebno:**

- 12 x 5 mL MRS bujona

- 12 x 50 mL MRS bujona

- 12 x 300 mL MRS bujona

- Falconice 50 mL i 15 mL

- 4 x 300 mL 0,9 % otopine NaCl-a (fiziološka otopina)

- 100 mL 2 % (w/v) Na-alginata

- 100 mL smjese 2 % (w/v) Na-alginata i 5 % (w/v) prebiotika (dodano 0,7 g FOS na 13,3 mL alginata)

- 3 L 1 %-tne otopine kalcijeva klorida

- 1 L 2 % Na-citrata

- 100 mL obranog mlijeka (10 %)

- 12 igli

- šprice

- 100 mL simuliranog želučanog soka

- 100 mL soka tankog crijeva

- 100 mL obranog mlijeka (10%)

- pencilinke i čepovi

**Protokol:**

**03.06.2023.**

- sojeve *L. fermentum* MC1 i D12 te *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 precijepiti u 2 paralele po 5 mL svježeg MRS bujona i staviti na anaerobnu prekonoćnu inkubaciju na 37 °C

**04.06.2023.**

**-** sojeve *L. fermentum* MC1 i D12 te *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 precijepiti u 2 paralele po 50 mL svježeg MRS bujona i staviti na anaerobnu prekonoćnu inkubaciju na 37 °C

**05.06.2023.**

**-** sojeve *L. fermentum* MC1 i D12 te *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 precijepiti u 2 paralele po 300 mL svježeg MRS bujona i staviti na anaerobnu prekonoćnu inkubaciju na 37 °C

**06.06.2023.**

- prekonoćne kulture od 300 mL preliti u Falconice od 50 mL i centrifugirati 10 min pri 4200 o/min (4 °C)

- talog (stanice) isprati 2 puta s 15 mL 0,9 % otopine NaCl-a (fiziološka otopina)

- odrediti početan broj (100 µL u 900 µL fiziološke otopine do 10-8 razrjeđenja i nacijepiti u 2 paralele po 10 µL na MRS agar); uzeli 1 mL

- nakon određivanja broja, suspenziju bakterijskih stanica ponovno centrifugirati 10 min pri 4200 o/min (4 °C) i nakon odlijevanja supernatanta talog bakterijske suspenzije resuspendirati u 14 mL (stanice smo ispirali u 15 mL fiziološke i nakon što smo uzeli 1 mL za određivanje početnog broja, ostalo nam je 14 mL) smjese 2 % (w/v) Na-alginata i 5 % (w/v) FOS-a, odnosno samo 2 % (w/v) Na-alginata (kontrola)

- smjesu staviti u iglu (trebaju nam 2 igle po soju, za kontrolu i FOS) i postepeno ispuštati u tikvice s 150 mL 1 %-tne otopine kalcijeva klorida (udaljenost između igle i otopine kalcijeva klorida bi trebala biti oko 10 cm)

- kuglice ostaviti 1 sat na magnetskoj mješalici da se „stvrdnu“ (dio staviti na tresilicu)

- isprati kuglice sa sterilnom fiziološkom otopinom (lijevak + sterilna gaza)

**Tablica 1.** Mase mikrooinkapsuliranih kuglica

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **SOJ** | **ALGINAT** | **ALGINAT + FOS** |
| MB1 | 13,52 g | 17,53 g |
| MB2 | 15,37 g | 17,86 g |
| MB13 | 18,84 g | 13,63 g |
| MB20 | 17,9 g | 15,9 g |
| MC1 | 13,88 g | 15,03 g |
| D12 | 16,86 g | 17,44 g |

- odrediti broj stanica nakon mikroinkapsulacije (uzeli 1 gram kuglica); iskoristiti ovaj uzorak za izolaciju DNA za RAPD metodu\*

\* protokol se nalazi u folderu Mikroinkapsulacija → Određivanje prisutnosti sojeva u mikroinkapsuliranim uzorcima RAPD metodom

**Razbijanje stanica**

- 1 gram kuglica prebaciti u Falconicu od 15 mL i pomiješati s 5 mL 2 % Na-citrata, ponavljati postupak vorteksiranja i centrifugiranja dok se alginat nije potpuno otopio (alginat je topljiv u Na-citratu)

- nakon otapanja alginata, uzorke centrifugirati pa taloge resuspendirati u 900 µL fiziološke otopine (to je original, 0. razrjeđenje), napraviti do 10-8 razrjeđenja i nacijepiti u dvije paralele po 10 µL na MRS agar i staviti na anaerobnu inkubaciju na 37 °C

**Liofilizacija**

- 1 gram kuglica nakon mikroinkapsulacije u alginatu (kontrola i uz FOS) pomiješati s 1 mL obranog mlijeka (10 %) koji služi kao lioprotektor i staviti na -80 °C pa liofilizirati smrznute uzorke

- moramo imati minimalno **4** uzorka:

1. za određivanje broja nakon liofilizacije u obranom mlijeku,
2. za određivanje broja nakon prolaska kroz simulirane uvjete želučanog soka,
3. za određivanje broja nakon prolaska kroz simulirane uvjete želučanog soka i tankog crijeva,
4. za određivanje preživljavanja stanica nakon 1 mjesec

**07.06.2023.**

- one uzorke koje ćemo koristiti za ispitivanje broja živih stanica u mikroinkapsuliranim i liofiliziranim (u obranom mlijeku) uzorcima nakon 1 mjesec parafinirati i staviti na +4 °C

**Preživljavanje u simuliranim uvjetima GIT-a**

🡪 pratimo broj naraslih kolonija na MRS podlogama tijekom izlaganja simuliranom želučanom soku kroz 2 sata te simuliranom soku tankog crijeva tijekom naredna 4 sata mikroinkapsuliranih i liofiliziranih uzoraka

**09.06.2023.**

- uzorak (UZORAK 2) koji koristimo za preživljavanje samo nakon prolaska kroz želučani sok prebaciti u Falconicu od 15 mL (pomoću špatule) i tretirati s 3 mL simuliranog želučanog soka 2 sata na 37 °C

- nakon 2 sata inkubacije slijedi centrifuga, a talog stanica razbiti dodatkom 5 mL Na-citrata

- kada više nema kapsula treba centrifugirati uzorke te talog stanica resuspendirati u 900 µL fiziološke otopine (0. razrjeđenje)

- odrediti broj nakon prolaska kroz simulirane uvjete želučanog soka (naprave se razrjeđenja do 10-8 sa fiziološkom i nacijepi se u dvije paralele po 10 µL na MRS agar)

- uzorak (UZORAK 3) koji koristimo za preživljavanje nakon prolaska kroz cijeli GI trakt prebaciti u Falconicu od 15 mL (pomoću špatule) i tretirati s 3 mL simuliranog želučanog soka 2 sata na 37 °C

- nakon 2 sata, uzorke centrifugirati 10 min na 4200 o/min, supernatant odliti i talog resuspendirati u 3 mL simuliranog soka tankog crijeva i inkubirati 4 sata na 37 °C

- nakon 4 sata slijedi centrifuga, a talog stanica razbiti dodatkom 5 mL Na-citrata

- kada više nema kapsula treba centrifugirati uzorke te talog stanica resuspendirati u 900 µL fiziološke otopine (0. razrjeđenje)

- odrediti broj nakon prolaska kroz simulirane uvjete želučanog soka (naprave se razrjeđenja do 10-8 sa fiziološkom i nacijepi se u dvije paralele po 10 µL na MRS agar)

**12.06.2023.**

- izvaditi ploče iz inkubatora

- brojanje poraslih kolonija i proračun (Mikroinkapsulacija → Rezultati)

**Preživljavanje liofilizacije**

**07.06.2023.**

- 1 gram mikroinkapsuliranog i liofiliziranog uzorka (UZORAK 1) prebaciti u Falconicu od 15 15 mL (pomoću špatule) i pomiješati s 5 mL 2 % Na-citrata

- vorteksirati dok se alginat ne otopi te nakon toga centrifugirati 10 min pri 4200 o/min

- nakon centrifugiranja, ukloniti cijeli supernatant sa pipetmanom

- talog resuspendirati u 900 µL fiziološke otopine (to je original), napraviti do 10-8 razrjeđenja (100 µL u 900 µL fiziološke otopine), nacijepiti u dvije paralele po 10 µL na MRS agar i staviti na anaerobnu inkubaciju na 37 °C

**09.06.2023.**

- izvaditi ploče iz inkubatora

**12.06.2023.**

- brojanje poraslih kolonija i proračun (Mikroinkapsulacija → Rezultati)

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

**07.07.2023.**

- 1 gram mikroinkapsuliranog i liofiliziranog uzorka (UZORAK 5) prebaciti u Falconicu od 15 mL (pomoću špatule) i pomiješati s 5 mL 2 % Na-citrata

- vorteksirati dok se alginat ne otopi te nakon toga centrifugirati 10 min pri 4200 o/min

- nakon centrifugiranja, ukloniti cijeli supernatant sa pipetmanom

- talog resuspendirati u 900 µL fiziološke otopine (to je original), napraviti do 10-8 razrjeđenja (100 µL u 900 µL fiziološke otopine), nacijepiti u dvije paralele po 10 µL na MRS agar i staviti na anaerobnu inkubaciju na 37 °C

**10.07.2023.**

- izvaditi ploče iz inkubatora

- brojanje poraslih kolonija i proračun (Mikroinkapsulacija → Rezultati)