**Mikroinkapsulacija potencijalnih terapijskih biomolekula u alginatu uz dodatak prebiotika**

**Cilj:** mikroinkapsulacija purificiranih terapijskih biomolekula sojeva BMK u kombinaciji s prebiotičkim supstratima (FOS, GOS); ispitivanje njihove stabilnosti nakon mikroinkapsulacije (Bradford, SDS-PAGE, RS metoda)

**Biomolekule**: S-proteini izolirani iz MB1, MB2, MB13, MB20; EPS-i izolirani iz MC1 i D12

**- u 3 paralele:**

1. kontrola (bez dodatka prebiotika)
2. FOS
3. GOS

**Potrebno:**

- Falconice 50 mL i 15 mL

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

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

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

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

- 18 x 50 mL 1%-tne otopine kalcijeva klorida

- 200 mL 2% Na-citrata

- 18 igli

- šprice

- pencilinke i čepovi

**Reference:**

1. Vandenberg, G. W., Drolet, C., Scott, S. L., De la Noüe, J. (2001) Factors affecting protein release from alginate–chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/intestinal simulation. *Journal of Controlled Release*, **77**, 297-307. → For the basal encapsulation protocol, 2% (w:v) alginate was dissolved in water and BSA added at 25% loading rate (mass BSA: mass alginate). (**10 mg S-proteina/EPS-a na 2 mL Na-alginata**)

**Protokol:**

**15.05.2023.**

- izvagati 10 mg uzoraka S-proteina i EPS-a u penicilinke i resuspendirati u 2 mL 2% Na-alginata, odnosno 2% Na-alginata + 5% FOS-a

- prebaciti suspenzije u šprice i pomoću igle ispustiti u tikvice s 50 mL 1%-tne otopine kalcijeva klorida

- osim uzoraka treba pripremiti i kontrole (samo alginat i samo alginat + FOS)

- staviti tikvice na tresilicu 1h

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

**Tablica 1.** Mase mikrooinkapsuliranih kuglica

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **SOJ** | **ALGINAT** | **ALGINAT + FOS** | **ALGINAT + GOS** |
| MB1 (S-proteini) | 1,85 g | 2,35 g | 2,25 g |
| MB2 (S-proteini) | 2,56 g | 2,33 g | 2,31 g |
| MB13 (S-proteini) | 2,69 g | 2,37 g | 2,32 g |
| MB20 (S-proteini) | 2,7 g | 2,3 g | 2,37 g |
| MC1 (egzopolisaharidi) | 2,29 g | 2,21 g | 2,27 g |
| D12 (egzopolisaharidi) | 2,04 g | 2,19 g | 2,29 g |

\* kontrola (alginat) = 2,61 g; kontrola (alginat + FOS) = 2,34 g; kontrola (alginat + GOS) = 2,3 g

- zamrzavanje na -80 °C i liofilizacija

**16.05.2023.**

- tretman kuglica sa simuliranim uvjetima GIT-a

- inkubacija liofiliziranih kuglica 2h u simuliranom želučanom soku, ispiranje kuglica sterilnom destiliranom vodom, pa inkubacija kuglica 4h u simuliranom soku tankog crijeva

- nakon ispiranja streilnom destiliranom vodom, razbiti kuglice resuspendiranjem u 2% Na-citrata

- određivanje koncentracije S-proteina na uređaju BioSpec-nano

**Određivanje koncentracije S-proteina:**

- po 2 µL uzorka otpipetirati na leću i izmjeriti koncentraciju proteina