



## Bioaccumulation of Vitamin D3 by *Lactobacillus plantarum* and Optimization with Response Surface Methodology

Morteza Mohajeri Amiri<sup>1</sup>, Mohammad Reza Fazeli<sup>2</sup>, Nasrin Samadi<sup>2</sup>, Mohsen Amini<sup>3</sup>, Nasim Hayati Roodbari<sup>1</sup>

1. Department of Biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Drug and Food Control, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Quality Assurance Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Drug Design, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Article Information

#### Article history:

Received: 2017/05/14  
Accepted: 2017/06/18  
Available online: 2017/09/12

#### Article Subject:

Food Microbiology

IJMM 2017; 11(4): 35-44

#### Corresponding author:

Dr. Nasrin Samadi

Department of Drug and Food Control, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Quality Assurance Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Tel: 0982164121307

#### Email:

samadin@tums.ac.ir

### Abstract

**Background and Aims:** Vitamin D3 deficiency can cause many diseases such as rickets, osteopenia and osteoporosis and increases the risk of some types of cancer. Probiotic strain of *Lactobacillus plantarum*, which can store fat-soluble vitamin D3 in its bulk, can reduce the effects of vitamin D3 deficiency in addition to being able to produce products with probiotic benefits.

**Materials and Methods:** This research was carried out in 2016. By designing the one-factor-at-a-time tests, the range of possible effective variables on vitamin D3 absorption in bacterial mass and effective factors were selected. Optimization of vitamin D3 entrapment in biomass of bacteria was performed using response surface methodology via Box-Behnken design. The high-performance liquid chromatography was employed for determination of vitamin D3 quantities.

**Results:** Among the parameters affecting vitamin D3 entrapment, three factors including incubation temperature, initial vitamin D3 and sucrose concentrations were most effective. The optimal points were obtained at vitamin D3 concentration of 351723.537 IU/mL, sucrose concentration of 2.89 (g/L) and incubation temperature of 33.8 °C. The maximum value of vitamin D3 in dry cell weight of *L. plantarum* was 1028.5 IU/g which was consistent with the proposed statistical model.

**Conclusions:** In this study *L. plantarum* enriched with vitamin D3 was produced and optimized for the first time. Experimental and statistical studies confirm the accuracy and reliability of this optimization.

**KeyWords:** *Lactobacillus plantarum*, Vitamin D3, Box-Behnken design, Response surface methodology

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

### How to cite this article:

Mohajeri Amiri M, Fazeli MR, Samadi N, Amini M, Hayati Roodbari N. Bioaccumulation of Vitamin D3 by *Lactobacillus plantarum* and Optimization with Response Surface Methodology. 2017; 11 (4): 35-44



## تجمع زیستی ویتامین D3 توسط باکتری لاکتوباسیلوس پلانناروم و بهینه‌سازی آن با روش رویه پاسخ

مرتضی مهاجری امیری<sup>۱</sup>، محمدرضا فاضلی<sup>۲</sup>، نسرین صمدی<sup>۲</sup>، محسن امینی<sup>۲</sup>، نسیم حیاتی رودباری<sup>۱</sup>

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲. گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات تضمین کیفیت دارو، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳. گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** اثر کمبود ویتامین D3 در خطر ابتلای به بیماری‌هایی مانند نرمی استخوان، استئوپنی، پوکی استخوان و انواع سرطان، به‌خوبی شناخته‌شده است. سویه پروبیوتیک باکتری لاکتوباسیلوس پلانناروم که بتواند ویتامین محلول در چربی D3 را در توده زیستی خود ذخیره کند، علاوه بر اینکه می‌تواند زمینه‌ساز تولید محصولات با مزایای پروبیوتیک شود، احتمالاً اثرات نقص ویتامین D3 را کاهش خواهد داد.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه که در سال ۱۳۹۵ انجام شد، با طراحی آزمایش‌های یک فاکتور در زمان، گستره متغیرهای مؤثر احتمالی بر جذب ویتامین D3 در توده زیستی باکتری مشخص و فاکتورهای مؤثر انتخاب گردیدند. سپس با طرح رویه پاسخ، با انجام آزمایش‌های باکس-بنکن این متغیرها بهینه‌سازی شدند. روش تعیین کمی ویتامین در توده زیستی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) می‌باشد.

**یافته‌ها:** از میان فاکتورهای بررسی‌شده، سه فاکتور دما، غلظت اولیه ویتامین D3 و غلظت ساکارز از بقیه اهمیت بیشتری داشت. در غلظت اولیه ویتامین D3 ۳۷/۵۳۷ IU/mL، غلظت ساکارز افزوده‌شده به محیط کشت (g/L) ۲/۸۹ و دمای ۳۳/۸ درجه سلسیوس، بیشترین میزان انباشته شدن ویتامین در وزن خشک سلولی (IU/g) ۱۰۲۸/۵ به دست آمد که با مدل آماری پیشنهادی مطابقت داشت.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه، اولین گزارش در زمینه غنی‌سازی توده زیستی لاکتوباسیلوس پلانناروم با ویتامین D3 و بهینه‌سازی آن می‌باشد. مطالعات آزمایشگاهی و آماری انجام‌شده نشان‌دهنده صحت و اعتبار این بهینه‌سازی می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** لاکتوباسیلوس پلانناروم، ویتامین D3، آزمایش‌های باکس-بنکن، طرح رویه پاسخ

### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۲۴

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۲۸

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۶/۲۱

### موضوع:

میکروبیولوژی مواد غذایی

IJMM 1396; 11(4): 35-44

### نویسنده مسئول:

دکتر نسرین صمدی

گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات تضمین کیفیت دارو، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۸۲۱۶۴۱۲۱۳۰۷

پست الکترونیک:

[samadin@tums.ac.ir](mailto:samadin@tums.ac.ir)

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

مقادیر بالا مواجه باشد (۲). یکی از راه‌هایی که اخیراً برای غنی‌سازی مواد غذایی با مواد ضروری یادشده، به‌کاربرده می‌شود اضافه کردن یا ترکیب آن‌ها با مواد آلی است. میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک مانند لاکتوباسیل ها، که همواره از آن‌ها به‌عنوان غذا یا افزودنی‌های مفید یاد می‌شود، حامل مناسبی برای این منظور به شمار می‌روند. مطالعات مختلف نشان داده است که اگر پروبیوتیک‌ها به میزان کافی در رژیم غذایی انسان و دام وجود داشته باشند علاوه بر اینکه فضاهای اکولوژیک لوله گوارش را از

امروزه به علت شیوع سوء‌تغذیه و بیماری‌های ناشی از آن در جهان بحث غنی‌سازی مواد غذایی انسان و دام با ویتامین‌ها و املاح موردنیاز بسیار حائز اهمیت است (۱). ساده‌ترین شکل‌های غنی‌سازی عبارت است از اضافه کردن ریزمغذی‌هایی مثل سلنیوم، روی، مس، آهن، منگنز و ویتامین‌هایی مثل ویتامین‌های گروه A، B، D، E و ... به مواد غذایی که ممکن است با مشکلاتی مثل تخریب و ناپایداری این ترکیبات در مواد غذایی، عدم جذب مناسب آن‌ها توسط انسان یا دام و یا ایجاد سمیت آن‌ها در

ذکر کرد کاهش سمیت این عناصر در توده سلولی باکتری نسبت به زمانی است که به صورت آزاد در رژیم غذایی انسان و دام مورد استفاده قرار می‌گیرند (۵). یکی دیگر از مزایای احتمالی عمل غنی‌سازی، این است که یک محصول پروبیوتیک خود اثرات متعددی در زمینه جلوگیری از کلونیزه شدن پاتوژن‌ها در بدن، افزایش سطح ایمنی مخاطی، توانایی تثبیت فلور روده و غیره دارد که اگر بتوان آن را با یک یا چند ریزمغذی غنی نمود می‌توان محصولات جدید پروبیوتیک با کارایی و مزایای بیشتری تولید کرد (۶).

در این مطالعه از سویه لاکتوباسیلوس پلانتروم برای غنی‌سازی با ویتامین D3 استفاده شد. این میکروارگانیسم یک پروبیوتیک شناخته شده است و نقش آن در ایجاد تعادل میکروبی دستگاه گوارش، تثبیت آنزیم‌های گوارشی و نقش التیامبخش آن در سندروم روده تحریک‌پذیر (IBS) مشخص شده است (۶،۷). طراحی آزمایش و طرح رویه پاسخ، برای کاهش تعداد آزمایش‌های مبتنی بر سعی و خطا و کاهش هزینه‌های آزمایشگاهی در پژوهش‌های انجام شده در زمینه علوم پایه مورد توجه قرار گرفته است (۸). در این پژوهش به منظور بهینه‌سازی میزان جذب ویتامین D3 در توده سلولی باکتری از طرح رویه پاسخ و آزمایش‌های باکس-بنکن استفاده شد.

#### مواد و روش‌ها

##### انتخاب سویه، شرایط کشت و غنی‌سازی

در این مطالعه از باکتری *Lactobacillus ATCC 14917 plantarum* که در فرآورده‌های پروبیوتیکی و محصولات تخمیری دارای اهمیت است استفاده شد. محیط کشت پایه برای کشت باکتری، MRS براث بوده است (این محیط از شرکت Merck آلمان تهیه و طبق روش ارائه شده، آماده‌سازی گردید).

در غنی‌سازی سویه لاکتوباسیلوس پلانتروم با ویتامین D3، محیط کشت MRS براث به طور جداگانه با غلظت‌های مختلف ویتامین D3 بین ۵۰۰۰۰ IU/mL تا ۵۰۰۰۰۰ در ارلن مایرهای تیره‌رنگ آماده شد. ویتامین D3 برای انحلال و هموژنیزه شدن در محیط کشت به توپین ۸۰ به میزان ۰/۱٪ نیاز داشت. از کشت ۲۴ ساعته لاکتوباسیل مورد آزمون به میزان ۵٪ به محیط‌های با غلظت متفاوت ویتامین تلقیح شد و برای کشت اولیه، در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سلسیوس و pH حدود ۵/۷ گرمخانه گذاری گردیدند. سپس با طراحی آزمایش‌های یک متغیر در زمان،

دسترس میکروارگانیسم‌های پاتوژن حفظ می‌کنند، با ایجاد تعادل میان باکتری‌های مفید و مضر روده باعث یک تغییر مثبت در میکروفلور روده شده و عمل هضم مواد غذایی را بهبود می‌بخشند. همچنین، سویه‌های پروبیوتیک ایمنی موضعی لوله گوارشی را نیز تحریک می‌کنند (۳).

نقش ویتامین D3 (cholecalciferol) در تنظیم تعادل کلسیم در استخوان به خوبی توصیف شده است. در سال‌های اخیر نقش این ویتامین در تنظیم سیستم ایمنی شامل دفاع سلولی، رفع التهاب و ترمیم مورد توجه قرار گرفته است. کمبود ویتامین D3 هم در برخی کشورهای توسعه یافته و هم در اغلب کشورهای در حال توسعه شایع می‌باشد. در مطالعات اخیر ارتباط بیماری‌های تنفسی نیز با کمبود ویتامین D3 مشخص گردیده است. مطالعات همه‌گیرشناسی نشان می‌دهد که سطح پایین ویتامین D3 با اختلال عملکرد ریوی، افزایش بروز بیماری‌های نئوپلاستیک، عفونی و التهابی در ارتباط می‌باشد. مکانیسم‌های زمینه‌ای دخیل در این بیماری‌ها به طور کامل شناخته نشده است؛ با این وجود، به نظر می‌رسد میزان ویتامین D3 بر روی عملکرد سلول‌های ایمنی مثل سلول‌های دندریتیک، لنفوسیت‌های B و T، منوسیت‌ها و سلول‌های اپیتلیال تأثیر می‌گذارد. مقادیر قابل توجهی از ویتامین D3 در پوست انسان تحت تابش نور خورشید تشکیل می‌شود؛ ولیکن در فصول پاییز و زمستان کمبود ویتامین D3 می‌تواند کودکان را به بیماری‌های عفونی از جمله عفونت‌های باکتریایی و ویروسی مستعد سازد. ارتباط بین سطوح ویتامین D3 و عملکرد ایمنی خصوصاً در اطفال، استفاده از مکمل‌های ویتامین D3 را ضروری نشان می‌دهد (۴).

پروبیوتیک‌ها علاوه بر اینکه خود تولیدکننده یک سری ویتامین‌ها و حامل یک سری املاح هستند، اگر ریزمغذی‌ها (ویتامین‌ها و املاح ضروری) به نحوی در توده زیستی آن‌ها وارد گردد به این علت که در سیستم گوارش انسان و دام باقی می‌مانند، احتمالاً باعث آزاد شدن و جذب تدریجی این ریزمغذی‌ها در لوله گوارش میزبان خواهند شد. از آنجایی که کمبود ویتامین‌های محلول در چربی امروزه فراگیر شده است اگر بتوان ویتامین‌ها را در توده زیستی باکتری‌های پروبیوتیک وارد کرد می‌توان محصولات پروبیوتیک کارآمدی تولید کرد که کیفیت و ماندگاری بالاتری داشته باشند و همچنین، محصولاتی غنی شده برای پیشگیری از بیماری‌های ناشی از کمبود ویتامین باشند. از مزایای دیگری که برای پروبیوتیک‌های غنی شده با ویتامین‌ها می‌توان

متحرک شامل متانول ۶۰٪، ایزوپروپانول ۲۸٪ و آب دیونیزه ۱۲٪، سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر در دقیقه، دگاز حلال‌های فاز متحرک قبل شروع کروماتوگرافی و در طول کار با گاز هلیوم، میزان دمیدن اولیه ۱۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه و در طول کار با سرعت جریان ۱۰ میلی‌لیتر هلیوم در دقیقه، فاز ثابت شامل ستون C18 بود و ردیابی توسط دتکتور UV با طول موج ۲۶۵ نانومتر انجام شد. حجم لوپ تزریق ۵۰ میکرولیتر و حجم تزریقی توسط سرنگ همیلتون به داخل لوپ ۸۰ میکرولیتر بود. ثبت و پردازش داده‌ها و رسم منحنی‌ها توسط کامپیوتر و با استفاده از نرم‌افزار Millennium® (شرکت Waters، میلفورد، آمریکا) انجام شد. مدت ثبت داده‌ها برای هر تزریق (run time) ۲۲ دقیقه و زمان بازدارندگی (retention time) برابر ۱۴ دقیقه برای ویتامین D3 اندازه‌گیری شد.

بعد از آماده کردن سیستم HPLC و به تعادل و ثبات رسیدن فاز متحرک در مسیر ستون و فراهم آمدن شرایط لازم جهت تزریق نمونه ابتدا از محلول‌های کاری استاندارد به میزان ۸۰ میکرولیتر توسط سرنگ همیلتون در لوپ تزریق شد و پس از اطمینان از تعادل سیستم نمونه‌های باکتری آماده‌سازی و تزریق گردید. برای آماده‌سازی نمونه‌ها جهت تزریق به HPLC ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فاز متحرک در هر لوله حاوی عصاره نمونه افزوده و ۳۰ ثانیه ورتکس شد. سپس ۸۰ میکرولیتر از محلول حاصله توسط سرنگ همیلتون بعد از خارج کردن هوا و با دقت داخل لوپ تزریق شد.

### طراحی آزمایش و طرح رویه پاسخ

از بین فاکتورهای موردبررسی از طریق روش یک متغیر در زمان، سه فاکتور غلظت اولیه ویتامین، دمای گرمخانه گذاری و میزان ساکارز افزوده‌شده، در غنی‌سازی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم با ویتامین D3 مؤثر شناخته شدند. سپس با استفاده از طرح رویه پاسخ و مدل باکس-بنکن، ۱۷ آزمایش طراحی شده با نرم‌افزار آماری Design Expert® (نسخه ۱۰،۱،۱، شرکت Stat-Ease، مینیاپولیس، آمریکا) برای بررسی شرایط بهینه‌سازی سه فاکتور یادشده انجام گرفت. این آزمایش‌ها، هر متغیر را در سه سطح حداقل، حداکثر و بهینه بررسی می‌کند. تعداد ۵ آزمایش از سری آزمایش‌های باکس-بنکن، تکراری و برای بررسی دقت آزمون طراحی شده است. پاسخ آزمایش‌های باکس-بنکن با استفاده از نرم‌افزار آماری مذکور موردبررسی قرار گرفت و بهترین مدل ریاضی پیشنهادی مورد استفاده قرار گرفت. با تحلیل آماری

گستره و اثربخشی متغیرهای مؤثر احتمالی برافزایش جذب ویتامین D3 در توده سلولی باکتری، شامل: غلظت اولیه ویتامین در محیط کشت، میزان تلقیح اولیه باکتری به محیط کشت، میزان افزودن ساکارز، دمای گرمخانه گذاری، pH و زمان نمونه‌برداری موردبررسی قرار گرفت. نمونه‌ها پس از استخراج چربی از نظر میزان ویتامین D3 موردسنجش قرار گرفتند.

### استخراج ویتامین D3 از باکتری

ابتدا حجم معینی از محیط‌های کشت در ۳۰۰×g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی جدا گردید. رسوب حاصله سه بار با سرم فیزیولوژی شستشو و در ۳۰۰×g سانتریفوژ شد. برای شکستن سلول باکتری ابتدا توده سلولی سه بار شسته شده باکتری در بافر فسفات سالین حاوی ۱٪ گلیسرول سوسپانسیون و ورتکس گردید. سپس لیزوزیم اضافه شد و سوسپانسیون حاصل مخلوط و هموزن گردید. محلول نهایی با فرکانس خفیف ۵ کیلوهرتز و مدت ۲۰ ثانیه سونیکه شد تا توده سلولی یکدست گردد. در مرحله بعد، لوله‌های فالفون حاوی نمونه در حمام یخ قرار گرفت. برای شکستن دیواره سلولی، سوسپانسیون‌های حاصل به مدت ۶۰ تا ۹۰ ثانیه در ۴۰ کیلوهرتز با پالس‌های ۱۰ ثانیه‌ای و وقفه ۶۰ ثانیه برای جلوگیری از داغ شدن نمونه و تخریب ویتامین‌ها سونیکه شدند. لایزیت‌های حاصل در ۴ درجه سلسیوس و دور ۱۰۰۰۰×g سانتریفوژ گردیدند. مایع رویی جدا گردید و از فیلتر ۰/۲۲ μm عبور داده شد.

برای استخراج ویتامین D3 از توده سلولی باکتری، ۵۰۰ میکرولیتر از مخلوط لیز شده سلولی (لایزیت) داخل میکروتیوب با گنجایش ۲ میلی‌لیتر اضافه گردید. به نمونه مورد مطالعه، ۱۰۰۰ میکرولیتر آن-هگزان اضافه گردید و ۱۰ دقیقه ورتکس شد. نمونه با دور ۱۲۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. ۸۰۰ میکرولیتر از فاز آلی به لوله‌آزمایش منتقل گردید. با استفاده از دستگاه Block Heater (مدل SBH200D/3، شرکت Stuart، انگلستان) در دمای ۴۰ درجه سلسیوس تحت گاز ازت حلال به سرعت تبخیر شد و باقی‌مانده در اتانول حل و برای آنالیز با HPLC استفاده گردید (۹).

### شرایط کروماتوگرافی

کروماتوگرافی HPLC از نوع فازمعکوس و با روش ایزوکراتیک انجام شد. شرایط کروماتوگرافی عبارت بود از: فاز

تا ۴ گرم در لیتر و pH ۶/۵ تا ۷/۵ بهترین گستره برای دستیابی به بیشترین میزان جذب ویتامین D3 در توده سلولی باکتری می‌باشند. نتایج مربوط به هر متغیر و تأثیر آن بر جذب ویتامین D3 در وزن خشک باکتری، نشان داد که در میان این فاکتورهای بررسی شده، سه فاکتور دمای گرمخانه گذاری، غلظت اولیه ویتامین D3 و غلظت ساکارز افزوده به محیط کشت، تأثیر بیشتری بر پاسخ داشتند.

### نتایج آزمایش‌های باکس- بنکن و انتخاب بهترین مدل پیشنهادی

همان‌طور که ذکر شد، با استفاده از نرم‌افزار آماری Design Expert® (نسخه ۱۰،۱،۱، شرکت Stat-Ease، مینیسوپولیس، آمریکا)، طراحی آزمایش‌های باکس- بنکن برای سه متغیر دمای گرمخانه گذاری، غلظت اولیه ویتامین D3 و غلظت ساکارز افزوده به محیط کشت در سه سطح بالا، پایین و بهینه استفاده گردید. آزمایش‌های ۱۷ گانه باکس- بنکن انجام شده، شرایط آزمایش و پاسخ‌های به دست آمده، در جدول ۱ موجود است. در این آزمایش‌ها سه فاکتور مؤثر برای تعیین نقطه بهینه با مقادیر متفاوت طراحی شدند و همان‌طور که مشاهده می‌شود، مقادیر پاسخ در ۵ آزمایش انتهایی که برای تعیین خطای انسانی و ابزاری مورد ارزیابی قرار گرفت تفاوت معنی‌داری نشان نداد.

پاسخ آزمایش‌های باکس- بنکن و بررسی آن‌ها توسط رسم نمودارهای آماری، نقطه بهینه توسط نرم‌افزار پیشنهاد شد. با انجام آزمایش پیشنهادی بالاترین میزان جذب ویتامین D3 توسط توده زیستی باکتری به دست آمد. برای بررسی نقاط بهینه و اثر هر یک از سه متغیر مورد بررسی بر آن، از نمودارهای سه‌بعدی استفاده گردید. آنالیز واریانس (ANOVA) و اندازه‌گیری آزمون F و P برای بررسی معنی‌داری بودن و صحت مدل مورد بررسی قرار گرفت.

### یافته‌ها

### نتایج آزمایش‌های یک متغیر در زمان برای شناسایی متغیرهای مؤثر

توسط انجام آزمایش‌های یک متغیر در زمان، گستره فاکتورهای احتمالی مؤثر، از جمله: فاکتور دمای گرمخانه گذاری، میزان تلقیح باکتری به کشت اولیه، میزان غلظت اولیه ویتامین، زمان نمونه‌برداری، غلظت ساکارز اضافه شده به محیط کشت، زمان نمونه‌برداری و pH مشخص گردید. طبق این آزمایش‌ها، دمای بین ۳۰ تا ۴۰ درجه سلسیوس، میزان تلقیح اولیه ویتامین بین  $10^5$  تا  $10^7$  (cfu/mL)، میزان غلظت اولیه ویتامین D3 بین ۲۰۰۰۰۰ تا ۴۰۰۰۰۰ (IU/mL)، زمان نمونه‌برداری بین ساعت ۱۸ تا ۲۴، غلظت اولیه ساکارز اضافه شده به محیط کشت بین ۱

جدول ۱: طراحی آزمایش‌های باکس- بنکن و پاسخ آن در غنی‌سازی لاکتوباسیلوس پلانتروم با ویتامین D3

استاندارد	ترتیب	فاکتور ۱ غلظت ساکارز (g/L)	فاکتور ۲ دما (°C)	فاکتور ۳ غلظت ویتامین D3 (IU/mL)	پاسخ: میزان جذب ویتامین D3 در وزن خشک باکتری (IU/g)
۱	۴	۱/۰۰	۳۰/۰۰	۳۰۰۰۰/۰۰	۶۴۲/۹۰۶۱
۲	۱۶	۴/۰۰	۳۰/۰۰	۳۰۰۰۰/۰۰	۷۷۵/۲۹۹۱
۳	۶	۱/۰۰	۴۰/۰۰	۳۰۰۰۰/۰۰	۳۴۷/۴۰۷۶
۴	۹	۴/۰۰	۴۰/۰۰	۳۰۰۰۰/۰۰	۴۹۸/۶۴۷۳
۵	۱۳	۱/۰۰	۳۵/۰۰	۲۰۰۰۰/۰۰	۵۵۷/۹۱۴۴
۶	۱۰	۴/۰۰	۳۵/۰۰	۲۰۰۰۰/۰۰	۷۷۲/۸۶۲۱
۷	۱۷	۱/۰۰	۳۵/۰۰	۴۰۰۰۰/۰۰	۸۰۲/۷۴۹۹
۸	۱۱	۴/۰۰	۳۵/۰۰	۴۰۰۰۰/۰۰	۹۲۱/۱۸۳۸
۹	۵	۲/۵۰	۳۰/۰۰	۲۰۰۰۰/۰۰	۶۷۵/۵۸۲۸
۱۰	۱۴	۲/۵۰	۴۰/۰۰	۲۰۰۰۰/۰۰	۳۶۵/۸۰۱۹
۱۱	۸	۲/۵۰	۳۰/۰۰	۴۰۰۰۰/۰۰	۸۱۵/۴۹۳۸
۱۲	۱	۲/۵۰	۴۰/۰۰	۴۰۰۰۰/۰۰	۵۸۲/۳۲۲۲
۱۳	۲	۲/۵۰	۳۵/۰۰	۳۰۰۰۰/۰۰	۹۵۸/۵۰۱۱
۱۴	۷	۲/۵۰	۳۵/۰۰	۳۰۰۰۰/۰۰	۹۷۲/۶۰۶۶
۱۵	۳	۲/۵۰	۳۵/۰۰	۳۰۰۰۰/۰۰	۹۶۲/۴۵۳۷
۱۶	۱۵	۲/۵۰	۳۵/۰۰	۳۰۰۰۰/۰۰	۹۸۷/۷۱۵۸
۱۷	۱۲	۲/۵۰	۳۵/۰۰	۳۰۰۰۰/۰۰	۹۵۸/۷۳۳۴

شناخته شد. در این مدل درجه دوم، پارامترهای آماری  $R^2$  و  $R^2$  میانگین ( $\text{adjusted } R^2$ ) بیشترین نزدیکی به عدد ۱ را داشتند. نقص برازش (Lack of fit) در این مدل معنی داری نیست (بهترین حالت برای این مقیاس معنی داری نبودن است) و مقدار P در کمترین حد خود قرار دارد ( $P < 0.001$ ) (جدول ۲).

پاسخ‌های به دست آمده از آزمایش‌های باکس- بنکن، برای مدل سازی مورداستفاده قرار گرفت. نتایج بررسی شده با نرم افزار نشان داد که مدل خطی برای این مطالعه مناسب نیست. مدل‌های فاکتوریل و مدل‌های مکعبی (درجه سوم) و بالاتر نیز مناسب نبوده و مناسب‌ترین مدل حالت درجه دوم (Quadratic)

جدول ۲: مقادیر آماری مقایسه‌ای برای انتخاب بهترین مدل طراحی باکس- بنکن در غنی سازی باکتری *L. plantarum* با ویتامین D3

مدل‌های ارائه شده	مقدار P ترتیبی	نقص در مقدار P	R میانگین <sup>۲</sup>	R میانگین پیش‌بینی شده <sup>۲</sup>
درجه اول	۰/۰۹۷۰	۰/۰۰۰۱ <	۰/۲۳۰۴	۰/۰۳۲۳
مدل فاکتوریل	۰/۹۹۳۰	۰/۰۰۰۱ <	۰/۰۰۸۰	۰/۷۶۶۶-
درجه دوم	۰/۰۰۰۱ <	۰/۳۹۹۲	۰/۹۹۶۲	۰/۹۸۵۹
درجه سوم	۰/۳۹۹۲	-----	۰/۹۹۶۶	-----

(value) نسبت به خطای خالص (pure error) در این مدل ۱/۰۹ است که معنی داری نیست. در مدل‌های آماری نقص برازش نسبت به خطای خالص نباید معنی داری باشد. بدین مفهوم که باید از ۰/۰۵ بیشتر باشد تا کفایت مدل تأیید گردد. در این مدل معنی داری، مقادیر  $R^2$  پیش‌بینی شده و  $R^2$  میانگین به هم بسیار نزدیک هستند که نشانگر صحت مدل در پیشگویی است. فاکتور کفایت دقت (Adeq Precision) باید بیش از ۴ باشد. در این مدل این میزان ۶۶/۹۳۳ است که دقت مدل را نشان می‌دهد. ضریب تغییرات ۱/۷۱٪ نشان‌دهنده میزان تغییرات کم مدل انتخابی، حول انحراف استاندارد است که قابل اطمینان بودن مدل را اثبات می‌کند (جدول ۳).

### آنالیز واریانس و نتایج آزمون‌های آماری

در این مدل آزمون F (F Value) برابر ۵۶۴/۳۰ است که نشان می‌دهد تنها احتمال ۰/۰۱٪ خطا (noise) در مدل وجود دارد. این آزمون، اعتبار مدل را نشان می‌دهد. مقدار P در مدل کمتر از ۰/۰۰۱ است. اگر مقدار آن در مدل کمتر از ۰/۰۵ باشد نشان می‌دهد مدل فوق معنی داری است. ضرایب A معرف غلظت ساکارز، B معرف دما، C معرف غلظت اولیه ویتامین D3 و همچنین ضرایب  $A^2$ ،  $B^2$ ،  $C^2$ ، AC و BC که تأثیر هر متغیر و تداخلات بین متغیرها را نشان می‌دهند، نیز دارای مقدار P کمتر از ۰/۰۵ هستند که نشان می‌دهد این ضرایب نیز معنی داری هستند. هرچه تعداد بیشتری از ضرایب معادله مدل معنی داری باشند مدل معتبرتر است. نقص برازش آزمون Lack of Fit F- F

جدول ۳: آنالیز واریانس ANOVA مدل درجه دوم تغییر یافته در غنی سازی باکتری *L. plantarum* با ویتامین D3

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار P	معنی داری
مدل	$1.0^5 \times 7.280$	۸	۹۱۰۰۷/۶۱	۵۶۴/۳۰	۰/۰۰۰۱ <	
A- غلظت ساکارز	۴۷۵۸۸/۳۶	۱	۴۷۵۸۸/۳۶	۲۹۵/۰۹	۰/۰۰۰۱ <	
B- دما	$1.0^5 \times 1.554$	۱	$1.0^5 \times 1.554$	۹۶۳/۸۲	۰/۰۰۰۱ <	
C- غلظت اولیه ویتامین	۷۰۲۳۵/۴۲	۱	۷۰۲۳۵/۴۲	۴۳۵/۵۳	۰/۰۰۰۱ <	
AC	۲۳۲۸/۷۲	۱	۲۳۲۸/۷۲	۱۴/۴۴	۰/۰۰۵۲	
BC	۱۴۶۷/۲۳	۱	۱۴۶۷/۲۳	۹/۱۰	۰/۰۱۶۷	
$A^2$	۶۴۷۷۲/۲۵	۱	۶۴۷۷۲/۲۵	۴۰۱/۶۵	۰/۰۰۰۱ <	
$B^2$	$1.0^5 \times 3.252$	۱	$1.0^5 \times 3.252$	۲۰۱۶/۴۸	۰/۰۰۰۱ <	
$C^2$	۲۷۱۴۶/۲۳	۱	۲۷۱۴۶/۲۳	۱۶۸/۳۳	۰/۰۰۰۱ <	
باقی مانده	۱۲۹۰/۱۳	۸	۱۶۱/۲۷			
نقص برازش	۶۷۳/۳۳	۴	۱۶۸/۳۳	۱/۰۹	۰/۴۶۷۲	غیر معنی داری
خطای خالص	۶۱۶/۷۹	۴	۱۵۴/۲۰			
میزان مجموع	$1.0^5 \times 7.293$	۱۶				
$R^2$	۰/۹۹۸۲					
R میانگین <sup>۲</sup>	۰/۹۹۶۵					
R میانگین پیش‌بینی شده <sup>۲</sup>	۰/۹۸۸۸					
کفایت دقت	۶۶/۹۳۳					
درصد ضریب تغییرات	۱/۷۱					

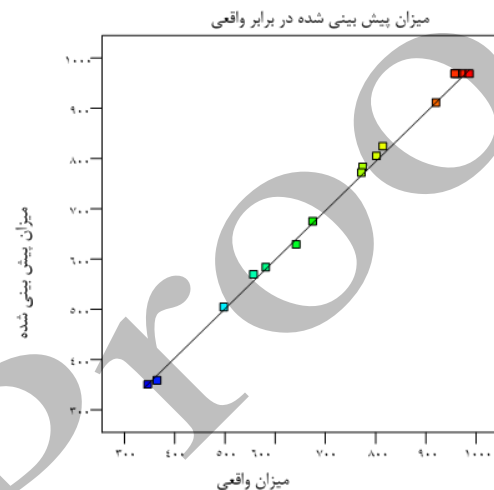
### مقدار بهینه جذب ویتامین D3 در توده زیستی باکتری و اعتبارسنجی آن

مدل انتخاب شده برحسب مقادیر پاسخ، پیشنهاد می‌دهد که در غلظت اولیه ویتامین D3 ۳۵۱۷۲۳/۵۳۷ IU/mL، غلظت ساکارز افزوده شده به محیط کشت (g/L) ۲/۸۹ و دمای ۳۳/۸ درجه سلسیوس میزان ویتامین در وزن خشک توده سلولی باکتری، ۱۰۱۸/۴۹۱ IU/g خواهد بود.

برای سنجش اعتبار مدل، نقطه بهینه که مدل در اختیار گذاشته است سه بار آزمایش شد و میانگین عددی IU/g ۱۰۲۸/۵ به دست آمد. این عدد با عدد پیش‌بینی شده نمودار ۹۹/۰۲٪ همخوانی دارد و در بازه تحمل ۹۵٪ بالا و پایین ارائه شده توسط نرم‌افزار که به ترتیب ۱۰۸۴/۹۳ و ۹۵۲/۰۵ هستند قرار دارد، که نشان‌دهنده معتبر بودن مدل می‌باشد.

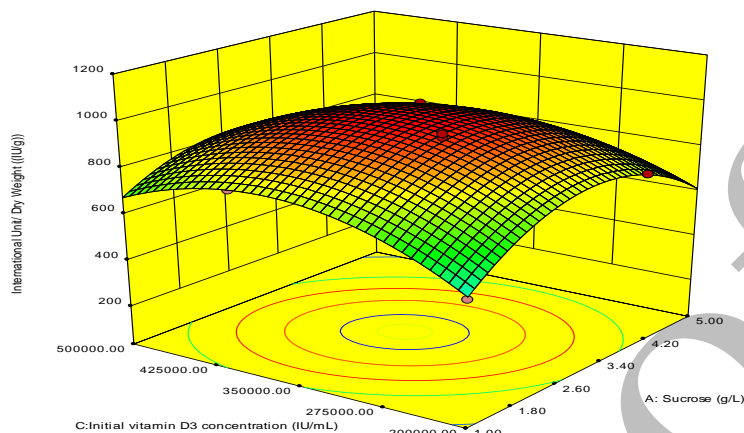
نمودارهای سه‌بعدی اثر برهم‌کنش دو فاکتور را زمانی که فاکتور سوم ثابت و در نقطه بهینه است، بر پاسخ اصلی نشان می‌دهند. نمودار ۲ برهم‌کنش دو متغیر غلظت اولیه ویتامین D3 و غلظت ساکارز بر تجمع زیستی ویتامین D3 در توده زیستی باکتری را نشان می‌دهد. در این نمودار، دما در نقطه بهینه (۳۵ درجه سلسیوس) ثابت فرض شده است. نمودار ۳ نمایش‌دهنده برهم‌کنش متغیرهای غلظت اولیه ویتامین D3 و دما بر تجمع زیستی ویتامین D3 در توده زیستی باکتری است. در این نمودار فرض بر آن است که غلظت ساکارز در میزان بهینه (۲/۵ g/L) قرار دارد. شکل نمودارها دارای قله می‌باشند. این اشکال تأیید می‌کنند که بهینه‌سازی فاکتورها به‌درستی انجام گرفته است و قله نمودارها نشان‌دهنده نقاط بهینه است.

برای ارزیابی مدل انتخاب شده در طرح باکس- بنکن از نمودارهای آماری استفاده شد. نمودار داده‌های حقیقی نسبت به مقادیر پیشگویی شده برای تعیین خطای ثابت کاربرد دارد. مقادیر مشخص شده در این نمودار باید از الگوی خطی تبعیت کنند تا مدل انتخابی، قابل قبول باشد. در این مطالعه پراکندگی داده‌های حول خط ۴۵ درجه نشان‌دهنده پیش‌بینی خوب مدل ارائه شده است (نمودار ۱).



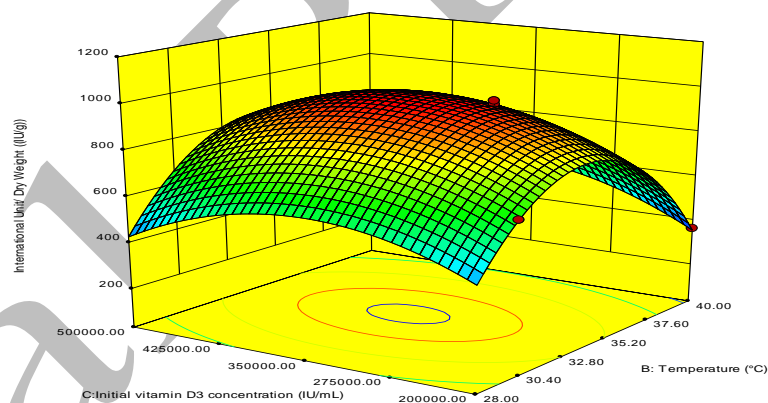
نمودار ۱: توزیع نرمال موارد حقیقی نسبت به مقادیر پیشگویی شده در مدل باکس- بنکن برای غنی‌سازی باکتری *L. plantarum* با ویتامین D3

Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 International Unit/ Dry Weight ((IU/g)  
 ● Design points above predicted value  
 ○ Design points below predicted value  
 987.716  
 347.408  
 X1 = A: Sucrose  
 X2 = C: Vitamin concentration  
 Actual Factor  
 B: Temperature = 35.00



نمودار ۲: نمایش سه بعدی اثر غلظت اولیه ویتامین D3 و غلظت ساکارز در غنی سازی توده زیستی باکتری *L. plantarum* با ویتامین D3 زمانی که دما در حالت بهینه قرار دارد

Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 International Unit/ Dry Weight ((IU/g)  
 ● Design points above predicted value  
 ○ Design points below predicted value  
 987.716  
 347.408  
 X1 = B: Temperature  
 X2 = C: Vitamin concentration  
 Actual Factor  
 A: Sucrose = 2.50



نمودار ۳: نمایش سه بعدی اثر غلظت اولیه ویتامین و دما در غنی سازی باکتری *L. plantarum* با ویتامین D3 زمانی که غلظت ساکارز در حالت بهینه قرار دارد.

وارد توده سلولی پروبیوتیک ها نمود، مطالعات کمی انجام گرفته است. از این میان، مطالعات انجام گرفته به غنی سازی توده سلولی برخی میکروارگانیسم ها با فلزات ضروری معطوف شده است (۱۰). در ارتباط با جذب چربی ها در باکتری ها نیز مطالعات بسیار کمی انجام شده است. در سال ۱۹۷۳، Olsen و Thomas نشان دادند که باکتریوفاژ حامل چربی PRDI توسط ناقل هایی می تواند جذب توده زیستی باکتری *E.coli* شود، که علاوه بر باکتریوفاژ، چربی نیز جذب باکتری می شد (۱۱). پژوهشی دیگر نیز در مورد

#### بحث

هدف از این مطالعه غنی سازی توده زیستی سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم با ویتامین محلول در چربی D3 به منظور تولید یک محصول پروبیوتیک غنی شده با ویتامین، برای اولین بار بود. بر اساس مطالعه انجام شده باکتری فوق توانست ویتامین D3 را در توده سلولی خود جذب کند.

در خصوص غنی سازی باکتری های پروبیوتیک که طی آن، بتوان با روش هایی ریزمغذی ها و مواد ضروری مثل ویتامین ها را



اسیدوفیلوس با طرح رویه پاسخ انجام گرفته است که در این مطالعه بهترین شرایط رشد این باکتری در pH ۴/۸ و میزان غلظت منبع نیترژن ۲۶/۸۸ گرم در لیتر عنوان گردید (۲۰). در سال ۲۰۱۵ مطالعه‌ای جدیدتر، اثر منبع ازت و املاح معدنی را در رشد لاکتوباسیلوس پلاننتاروم با روش باکس بنکن بهینه‌سازی کردند (۲۱).

این مطالعه که به منظور بهینه‌سازی تجمع زیستی ویتامین D3 در توده سلولی باکتری لاکتوباسیلوس پلاننتاروم انجام گرفت از اولین نتایج موفق در این زمینه محسوب می‌شود. همچنین این پژوهش، از اولین گزارش‌ها در زمینه معرفی فاکتورهای مؤثر بر جذب مواد محلول در چربی در لاکتوباسیل ها است. با روش یک متغیر در زمان، از میان چندین فاکتور استفاده شده در مطالعات قبل، سه فاکتور دما، غلظت اولیه ویتامین و ساکارز انتخاب گردیدند و با روش باکس- بنکن بهینه‌سازی انجام شد. با استفاده از نتایج این مطالعه احتمالاً می‌توان محصولات پروبیوتیک با قابلیت حمل ویتامین‌های محلول در چربی طراحی نمود. لیکن با توجه به اینکه گزارش مشابهی در این زمینه وجود ندارد، مطالعات بیشتری به منظور بررسی مکانیسم غنی‌سازی، رهایش برون تنی و درون تنی ویتامین از باکتری و همچنین معرفی این محصول به عنوان یک پروبیوتیک کاربردی، ضروری به نظر می‌رسد.

#### تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران (گرات شماره ۳۲۹۷۳) و پرسنل آزمایشگاه تحقیقات پروبیوتیک دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران سپاسگزاری می‌نمایند.

#### تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

باکتریوفازهای حامل چربی و باکتری‌های دیگری از جمله سالمونلا انجام شده است (۱۲). در مطالعه دیگری از لاکتوباسیل ها به عنوان مصرف کننده کلاسترول و کاهنده آن در بدن انسان یاد شده است (۱۳).

در ارتباط با گونه‌های باکتری لاکتوباسیل در زمینه رشد بهینه، تولید محصولاتی مثل اسیدلاکتیک، باکتریوسین و آگزوپلی ساکارید ها و جذب فلزات سنگین مطالعات متعددی انجام گرفته است و از طراحی آزمایش برای انتخاب و بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر استفاده گردیده است. در مطالعاتی که در زمینه بهینه‌سازی رشد انجام گرفته است، فاکتورهایی مثل دما، منبع کربن، دور همزن، منبع ازت، میزان تلقیح اولیه باکتری و pH اولیه مؤثر بوده‌اند (۱۴، ۱۵).

در سال ۲۰۰۲ مطالعه‌ای بر روی تولید باکتریوسین توسط لاکتوباسیل ها و همچنین اثر تلفیقی منبع ازت و منبع کربن بر روی تولید آن صورت گرفته است (۱۵). در مطالعه دیگری اثر دما بر رشد باکتری و تولید محصول باکتریوسین از لاکتوباسیل ها مشخص گردید (۱۶). در مطالعه‌ای که برای تولید آگزوپلی ساکارید ها از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس طراحی شده بود، اثر تلقیح اولیه باکتری به محیط کشت، میزان نمک و منبع کربن خصوصاً گلوکز و ساکارز تأیید شد (۱۷).

در ایران مطالعات اندکی در زمینه طراحی آزمایش برای بهینه‌سازی رشد و تولید محصولات مختلف از لاکتوباسیل ها انجام شده است. از این میان، Pedram و Ataei در سال ۲۰۱۴ اثر املاح پتاسیم و عصاره مخمر را بر رشد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بررسی کردند و توسط طرح رویه پاسخ، این پارامترها را مؤثر تشخیص داده و بهینه‌سازی کردند. در این مطالعه، میزان گلوکز ۵ تا ۸ گرم در لیتر و عصاره مخمر ۳۷ گرم در لیتر به عنوان میزان بهینه، معرفی گردیدند (۱۸). مطالعه‌ای دیگر برای تولید توده زیستی بیشتر از لاکتوباسیلوس پلاننتاروم، فاکتورهای دما و غلظت لاکتوز را با روش‌های طراحی آزمایش بهینه‌سازی کرد، که در این میان دمای ۳۱ درجه سلسیوس و غلظت لاکتوز ۰/۱ گرم در لیتر مقادیر بهینه تعیین گردیدند (۱۹). مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۴ بر روی لاکتوباسیلوس

## References

- Fitzpatrick TB, Basset GJC, Borel P, Carrari F, DellaPenna D, Fraser PD, et al. Vitamin Deficiencies in Humans: Can Plant Science Help? *Plant Cell* 2012; 24 (2):395–414.
- Medardus JJ, Molla BZ, Nicol M, Morrow WM, Rajala-Schultz PJ, Kazwala R, et al. In-Feed Use of Heavy Metal Micronutrients in U.S. Swine Production Systems and Its Role in Persistence of Multidrug-Resistant Salmonellae. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80 (7):2317–25.
- Hemarajata P, Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therap Adv Gastroentrol* 2013; 6 (1):39–51.
- Chau YY, Kumar J. Vitamin D in Chronic Kidney Disease. *Ind J Pediatr* 2012; 79(8):1062–8.
- Simm C, Lahner B, Salt D, LeFurgey A, Ingram P, Yandell B, et al. *Saccharomyces cerevisiae* vacuole in zinc storage and Intracellular zinc distribution. *Eukaryot Cell* 2007; 6 (7):1166–77.
- Farazandehnia N. The evaluation of antimicrobial effect of fermented probiotic milk produced *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium* and *Bifidobacterium angultum*. *Iran J Med Microbiol* 2016; 10 (3):31-8.
- Ershadian M, Arbab Soleimani N, Ajodani Far H, Vaezi Khakhki M R. The Co-aggregation effects of probiotic lactobacillus against some pathogenic bacteria. *Iran J Med Microbiol* 2015; 9 (3):14-22.
- Soltani M, Soltani J. Determination of optimal combination of applied water and nitrogen for potato yield using response surface methodology (RSM). *J Biosci Biotechnol Res Comm* 2016; 9 (1):46-54.
- Popović S, Kostadinović LM, Brkljača JS, Krulj JA, Manojlović MS, Solarov MIB. The development and validation of HPLC method for quantification of DL- $\alpha$ -tocopherol in quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Feed Res* 2014; 41 (2):147–52.
- Stehlik-Tomas V, Gulan Zeti V, Stanzer D, Grba S, Vahcic N. Zinc, Copper and Manganese enrichment in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol Biotechnol* 2004; 42 (2):115-20.
- Olsen RH, Thomas D. Characteristics and purification of PRRI, an RNA phage specific for the broad host range *Pseudomonas* RI 822 drug resistance plasmid. *J Virol* 1973; 12 (6):1560-7.
- Olsen RH, Shipley P. Host range and properties of the *Pseudomonas aeruginosa* R factor RI 822. *J Bacteriol* 1973; 113 (2):772-80.
- Smet P, Boever D, Verstraete W. Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. *Br J Nutr* 1998; 79 (2):185–94.
- Hwang CF, Chang JH, Hwang JY, Tsi CC, Lin CK, Tsen HY. Optimization of Medium Composition for Improving Biomass Production of *Lactobacillus plantarum* Pi06 Using the Taguchi Array Design and the Box-Behnken Method. *Biotechnol Bioprocess Engin* 2012; 17 (4):827-34.
- Leal-Sánchez MV, Jiménez-Díaz R, Maldonado-Barragán A, Garrido-Fernández A, Ruiz-Barba JL. Optimization of Bacteriocin Production by Batch Fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68 (9):4465–71.
- Keren T, Yarmus M, Halevy G, Shapira R. Immunodetection of the Bacteriocin Lacticin RM: Analysis of the Influence of Temperature and Tween 80 on Its Expression and Activity. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70 (4):2098–104.
- Sanchez JJ, Martínez B, Guillén R, Jiménez-Díaz R, Rodríguez A. Culture Conditions Determine the Balance between Two Different Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72 (12):7495–502.
- Pedram A, Ataei SA. Optimization of a Modified GS Medium for a Probiotic Strain (*L. acidophilus* ATCC4356). *Appl Food Biotechnol* 2014; 1 (1):25-9.
- Brinques GB, Peralba MC, Ayub MAZ. Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2010; 37(2): 205–12.
- Brzozowski B, Lewandowska M. Prolyl endopeptidase —Optimization of medium and culture conditions for enhanced production by *Lactobacillus acidophilus*. *Electron J Biotechnol* 2014; 17 (5):204–10.
- Thirumurugan A, Ramachandran S, Gobikrishnan S. Optimization of medium components for maximizing the bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ATM11 using statistical design. *Int Food Res J* 2015; 22 (3):1272-9.