



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

## **FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS**

### **AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES**

#### **CARRERA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL**

## **EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROBIÓTICA DE CEPAS OBTENIDAS A PARTIR DE FRUTOS SILVESTRES NATIVOS.**

#### **Autor:**

Mario Elicio Ulcuango Conlago

#### **Directora:**

Dra. Lucía Cumandá Yépez Vásquez. MSc

#### **Comité Lector:**

Dra. Gabriela N. Tenea, Ph.D  
Ing. Juan Carlos de la Vega, MSc  
Ing. Rosario Espín, MSc

**Ibarra – Ecuador**

**2016**

#### **Lugar de investigación:**

Laboratorio de análisis físicos-químicos, microbiológico y de biología molecular de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Técnica del Norte.

## HOJA DE VIDA DEL INVESTIGADOR



**NOMBRE** : Mario Elicio Ulcuango Conlago  
**CÉDULA DE IDENTIDAD** : 172467933-5  
**FECHA DE NACIMIENTO** : 05 de diciembre de 1991  
**EDAD** : 24 años  
**LUGAR DE NACIMIENTO** : Cayambe-Pichincha  
**NACIONALIDAD** : Ecuatoriano  
**ESTADO CIVIL** : Soltero  
**CIUDAD DE RESIDENCIA** : Cayambe - Ayora  
**DIRECCIÓN** : Comunidad Santo Domingo N 2  
**TELÉFONO CELULAR CLARO** : 0991675976  
**TELÉFONO** : 022169002  
**CORREO ELECTRÓNICO** : marito\_nevado@hotmail.com

## FORMATO DEL REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

**ULCUANGO CONLAGO, MARIO ELICIO.** EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROBIÓTICA DE CEPAS OBTENIDAS A PARTIR DE FRUTOS SILVESTRES NATIVOS/ TRABAJO DE GRADO. Universidad Técnica del Norte. Carrera de Ingeniería Agroindustrial. Ibarra, 05 de Diciembre de 2016.

**DIRECTORA: Yépez, Lucía**

La presente investigación tuvo como objetivo general la evaluación del potencial probiótico de cepas microbianas puras, obtenidas a partir de frutos silvestres nativos.

Para los análisis se utilizó la información recolectada durante la fase de diagnóstico, la cual dio lugar a observaciones y mejoras para la evaluación de la capacidad probiótica, enfocándose principalmente en la obtención de nuevas cepas probióticas de acuerdo a los estándares.

**Ibarra, 05 de Diciembre de 2016**



**Dra. Lucía Cumandá Yépez Vásquez. MSc**  
**Directora de Tesis**



**Mario Elicio Ulcuango Conlago**  
**Autor**

## ARTÍCULO CIENTÍFICO

### TÍTULO: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROBIÓTICA DE CEPAS OBTENIDAS A PARTIR DE FRUTOS SILVESTRES NATIVOS.

#### AUTOR:

Mario Elicio Ulcuango Conlago

#### DIRECTORA:

Dra. Lucía Cumandá Yépez Vásquez. MSc

**RESUMEN.** En este estudio, se evaluaron las propiedades probióticas *in vitro* de algunas bacterias ácido lácticas, aisladas de frutos silvestres nativos de la selva subtropical del Ecuador. Se aislaron más de 100 colonias de cada material biológico y se seleccionaron cinco cepas: cepa uno (UTNFa37), cepa dos (UTNFa38), cepa tres (UTNFa39), cepa cuatro (UTNFa40) y cepa cinco (UTNFa41); para ser caracterizadas fenotípicamente mediante técnicas microbiológicas básicas: tinción Gram, actividad de catalasa, producción de sulfuros, indol, movilidad y gas (CO<sub>2</sub>). En función de sus propiedades morfológicas se identificaron dos grupos de cepas: *Lactococcus* y *Lactobacillus*.

Las cepas seleccionadas fueron caracterizadas por sus propiedades probióticas así como: tolerancia a pH ácidos que se asemejan a los jugos gástricos, bilis, crecimiento a diferentes temperaturas de

incubación y la tolerancia en condiciones salinas.

Las cepas seleccionadas sobreviven a medios ácidos en el rango de pH de 2.5 hasta 4.5 y fueron tolerantes a 0.3% de bilis; propiedades que indican su probable potencial probiótico. Las cepas seleccionadas fueron cultivadas a diferentes temperaturas de 15 °C, 37 °C y 45 °C; con adición de diferentes concentraciones de sal. Las cepas: UTNFa37, UTNFa38, UTNFa39, UTNFa40 y UTNFa41, crecen en todas las temperaturas; mientras que UTNFa39 crece mejor a la temperatura de 15 °C y todas toleran al cloruro de sodio.

La investigación realizada es la primera noticia sobre la presencia de bacterias ácido lácticas en nichos ecológicos nativos del Ecuador. Los resultados muestran el valioso potencial probiótico de las cinco bacterias ácido lácticas estudiadas, demostrando su capacidad de tolerar la bilis, las condiciones

de acidez elevadas y a diferentes concentraciones de sal. Por lo que se concluye que las cepas de bacterias aisladas de frutos silvestres poseen capacidad probiótica.

**Palabras Clave.** Bacteria ácido láctica, probiótico, potencial, tolerancia a bilis.

**ABSTRACT.** In this study were evaluated *in vitro* the probiotic characteristics of some lactic acid bacteria, isolated on native wild type fruits of the subtropical forest of Ecuador. More than 100 colonies were isolated from each biological material, and five selected strains: strain one (UTNFa37), strain two (UTNFa38), strain three (UTNFa39), strain four (UTNFa40) and strain five (UTNFa41) were further characterized phenotypically by basic microbiological techniques: Gram stain, catalase activity, sulfide production, indol, mobility and gas (CO<sub>2</sub>). Based on their morphological properties the selected strains were conferred in two groups: *Lactococcus* and *Lactobacillus*.

The selected strains were evaluated for their probiotic properties as well as tolerance to gastric juices, bile, growth at different incubation temperatures and tolerance in saline conditions.

The selected strains survived in acidic media within the pH ranges of 2.5 to 4.5 and they

were tolerant at 0.3% bile; properties that indicate to be considered as probiotics: each of the strain grew in different temperatures of 15 °C, 37 °C y 45 °C as well as different concentrations of medium chloride. The strains assigned UTNFa37, UTNFa38, UTNFa40, UTNFa41, grew at all temperature tested while UTNFa39 grew better at temperature of 15 °C and tolerance of medium chloride.

The research is the first news about the presence of lactic acid bacteria in native ecological niches of Ecuador. The results indicated valuable probiotic potential, demonstrated by its ability to tolerate bile, conditions of high acidity, tolerance different medium chloride concentrations. So it is concluded that strains of bacteria isolated from wild fruits have probiotic capacity.

**Key Words.** Lactic acid bacteria, probiotic, potential, bile tolerance.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son bacterias Gram positivas, conocidas como probióticas debido a su resistencia en condiciones de acidez, alta tolerancia a bilis y cloruro de sodio y su capacidad altamente antagónica frente a bacterias patógenas. La presente investigación tuvo como objetivo el

aislamiento, identificación y evaluación de las capacidades probióticas de cepas de bacterias ácido lácticas obtenidas de frutos silvestres nativos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

**Material biológico:** Frutos silvestres nativos de la estación La Favorita, provincia de Santo Domingo de los Tsachilas, parroquia Alluriquín Ecuador.

## 3. FACTORES EN ESTUDIO

**FACTOR A:** cinco cepas de frutos silvestres y un mix de cepas de un probiótico comercial.

**A1:** BAL 1

**A2:** BAL 2

**A3:** BAL 3

**A4:** BAL 4

**A5:** BAL 5

**A6:** *Lactobacillus fermentum* y *L. delbrueckii* (probiótico comercial)

**FACTOR B:** bilis.

**B1:** 0.3%

**FACTOR C:** pH ácidos

**C1:** 2.5

**C2:** 3.0

**C3:** 3.5

**C4:** 4.0

**C5:** 4.5

**FACTOR D:** diferentes temperaturas de incubación.

**D1:** 15 °C

**D2:** 37 °C

**D3:** 45 °C

**FACTOR E:** diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl).

**E1:** 2%

**E2:** 4%

**E3:** 6%

## Análisis funcional

**Tratamientos:** Tukey al 5%

**Factores:** DMS (diferencia mínima significativa)

## 4. VARIABLES EVALUADAS

Densidad óptica a 605nm

Recuento de microorganismos en placas (UFC)

Curvas de crecimiento: absorbancia (605nm) vs tiempo (minutos)

Gráficos de supervivencia de microorganismos: recuento en placas (UFC) vs tiempo (horas)

## 5. AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE LOS FRUTOS SILVESTRES

Los frutos nativos fueron transportados a los laboratorios en fundas ziploc y refrigerados, ubicados en agua destilada estéril dejando fermentar durante tres días a 25 °C. Para aislar las bacterias ácido lácticas utilizando medio agar MRS y luego las bacterias seleccionadas fueron purificadas y almacenadas a -80 °C.

## 6. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

La identificación fenotípica se realizó por métodos básicos como son: tinción Gram, actividad de catalasa, producción de H<sub>2</sub>S,

movilidad, producción de indol, producción de gas CO<sub>2</sub>, Aquihuatl Ramos, et al., (2012)

## **7. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROBIÓTICA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS**

La capacidad probiótica de cinco cepas de BAL seleccionadas y el probiótico comercial fue evaluada mediante métodos bioquímicos.

### **Tolerancia a bilis**

Esta evaluación se realizó según Pedersen, Jonsson, Lindberg, & Roos, (2004); Ramirez-Chavarin, Wachter, Eslava-Campos, & Perez Chabela, (2013); (Aguirre Rodríguez & Moreno Cardozo, (2012) con algunas modificaciones. El diseño utilizado fue completamente al azar (D.C.A); donde los tratamientos son las cinco cepas en estudio y un testigo comercial (FACTOR A) sometidas a un medio de cultivo selectivo caldo MRS con 0.3% de bilis e incubadas a temperatura constante de 37 °C.

### **Tolerancia a diferentes pH ácidos**

Las guías o protocolos de Aguirre Rodríguez & Moreno Cardozo (2012); Ramirez-Chavarin, Wachter, Eslava-Campos, & Perez Chabela, (2013); Victoria-León, Totosaus, Guerrero, & Pérez-Chabela, (2006) fueron adecuados para realizar la experimentación. El diseño utilizado es el completamente al azar (D.C.A) con arreglo factorial (Ax C),

siendo los factores en estudio FACTOR A (cinco cepas y un testigo comercial) y FACTOR C (pH 2.5-3.0-3.5-4.0 y 4.5).

### **Determinación de la temperatura óptima de crecimiento de las bacterias seleccionadas**

Las guías o protocolos utilizados para la experimentación fue el siguiente (Powthong & Suntornthiticharoen, (2013). También se realizó un diseño completamente al azar (D.C.A), con arreglo factorial (Ax D), donde el FACTOR A (cinco cepas y un testigo comercial) y el FACTOR D (temperaturas de incubación 15°, 37° y 45° C).

### **Evaluación de la tolerancia en cloruro de sodio en relación con la temperatura de crecimiento**

Se realizó según Powthong & Suntornthiticharoen, (2013) con algunas modificaciones. Por último se realizó un diseño completamente al azar (D.C.A) con arreglo factorial (Ax DxE); donde el FACTOR A (cinco cepas y un testigo comercial), FACTOR D (temperaturas de incubación 15°, 37°, 45 °C) y el FACTOR E (concentraciones de cloruro de sodio 2, 4, 6%).

## **8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Caracterización fenotípica de las cepas**

Los resultados obtenidos mostraron que las cepas aisladas de los frutos fueron

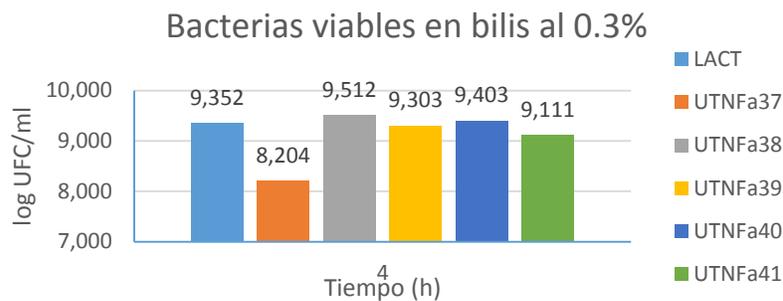
identificadas como bacterias ácido lácticas debido a su perfil fenotípico tales como: Gram (+), actividad de catalasa (-), producción de sulfuros, indol y movilidad (-) y la producción de gas CO<sub>2</sub> de glucosa (+); ayudando a identificar a las bacterias en cadena de cocos y bacilos y, siendo

clasificados en los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus*

Aquiahuatl Ramos, et al., (2012) mantiene que “las bacterias ácido lácticas deben ser Gram positivas, catalasa negativa, SIM negativo como las pruebas con mayor relevancia”

## Determinación de la capacidad probiótica

### Tolerancia a bilis



**Gráfico 1.** Cálculo de microorganismos vivos en 0.3% de bilis

El ensayo bioquímico de tolerancia a bilis muestra que las cinco cepas en estudio son tolerantes al 0.3% bilis, obteniéndose un valor promedio en la supervivencia de 9.148 UFC/ml siendo un valor muy similar con el probiótico comercial de 9.352 log UFC/ml; el gráfico 1 presenta el número de bacterias que sobreviven durante 4 horas de incubación en medio con 0.3% bilis de las cepas en estudio y el probiótico comercial mediante el recuento en placas (log UFC/ml). Todas las cepas en estudio sobreviven en condiciones de bilis siendo la mayor cepa asignada

UTNFa38. De acuerdo a lo que sostiene Iranmanesh, et al., (2012) que “el desafío para los posibles probióticos sobrevivientes en el tracto gastrointestinal es exposición a las sales biliares en la parte superior del intestino delgado. Siendo la concentración de la bilis humana de 0.3% a 0.5%, sin embargo 0.3% se considera una concentración crítica para identificar cepas de bacterias resistentes”.

## Supervivencia a medios ácidos (pH ácidos)

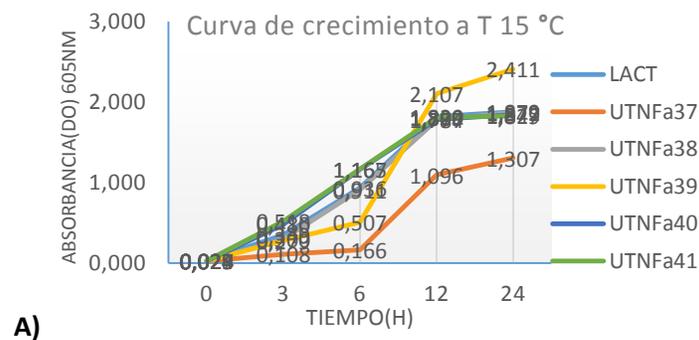


**Gráfico 2.** Viabilidad de BAL en pH 2.5 después de 3 horas de incubación

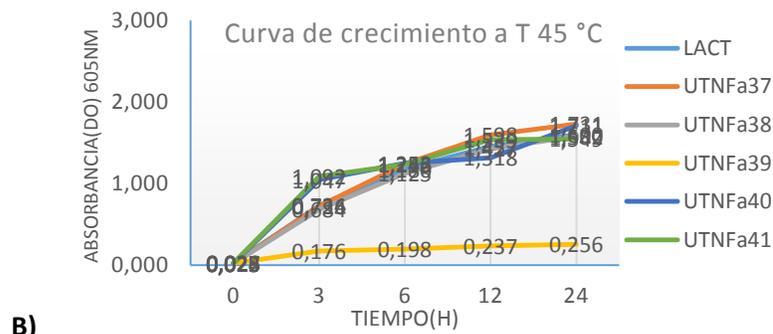
Las cepas en estudio si se adaptan a medios ácidos, sobreviviendo a concentraciones extremas de HCl como fue en el rango de 2.5 a 4.5. Los resultados en el gráfico 2 indican que a pH 2.5 la viabilidad de las cepas disminuye debido al tiempo de exposición. La media calculada a la primera fue de  $5.378 \pm 0.265$  log UFC/ml y a la tercera hora fue de  $2.238 \pm 0.706$  log UFC/ml lo que indica que las bacterias perdieron estabilidad; llegando a determinar la supervivencia de las mismas y considerándose la mejor cepa UTNFa37, por

sobrevivir en mayor cantidad a esta condición con un valor de 3.228 log UFC/ml. Según Ramirez-Chavarin, Wachter, Eslava-Campos, & Perez Chabela, (2013) “las bacterias son generalmente sensibles a bajos valores de pH en el estómago, sin embargo, algunas bacterias ácido lácticas pueden sobrevivir y crecer a pH relativamente bajo porque tienen un sistema que transporta simultáneamente ácido láctico y protones para el exterior de la célula.

## Tolerancia a temperaturas de incubación



A)



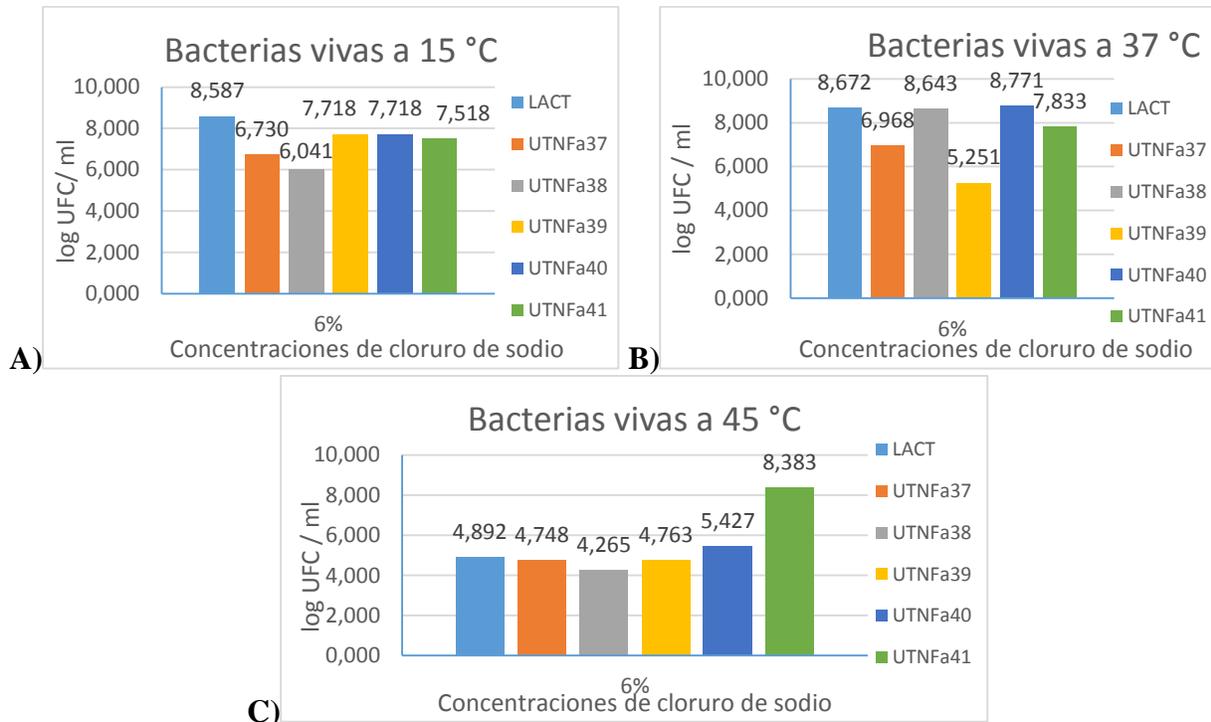
**Gráfico 3.** Curvas de crecimiento a temperaturas de incubación A) 15 y B) 45 °C

El gráfico 3 se observa que las bacterias se desarrollaron con mayor eficiencia en la condición de temperatura de 37 °C, produciendo gran cantidad de biomasa. Observándose que la bacteria UTNFa39, es la mejor biomasa producida en condiciones de temperatura de 15 °C y que a 37 °C el resto de cepas se desarrollan de manera más acelerada, mientras que a 45 °C su producción de biomasa es elevada en comparación con el probiótico comercial. Las cepas en estudio toleran temperaturas extremas de incubación que ayudarían a posteriores estudios biotecnológicos.

De acuerdo a lo que sostiene De la Rosa Fraile, Prieto Prieto, & Navarro Marí, (2011) “el crecimiento de las bacterias en un nuevo

medio de cultivo líquido, comienza a multiplicarse de acuerdo con las dinámicas, teniendo como fase de latencia, exponencial, estacionaria y declive”. Además menciona Iranmanesh, et al., (2012) que “de ser resistentes al ácido y la bilis, otra propiedad importante de algunos de estos aislamientos fue su tolerancia a la temperatura. Resistencia a temperaturas altas, las bacterias se ven afectadas por factores genéticos, las diferencias entre especies, el estado fisiológico de las células y los factores ambientales como pH, actividad del agua, contenido de cloruro de sodio y conservantes”.

**Tolerancia a diferentes concentraciones de cloruro de sodio en correlación con las temperaturas de incubación.**



**Gráfico 4.** Células vivas que toleraron al cloruro de sodio y temperaturas de Incubación A) 15°C, B) 37 °C y C) 45 °C.

El gráfico 4 se observa que las cepas en estudio toleran elevadas concentraciones de cloruro de sodio y que también influye el parámetro temperatura en su desarrollo. Con la finalidad de determinar el número de cepas que sobreviven al final del experimento, se realizó un recuento en placas expresadas en log UFC/ml de muestra. Las cepas con mayor resistencia a la concentración de 6% de cloruro de sodio fueron UTNFa39 a 15 °C, UTNFa40 a 37 °C y UTNFa41 a 45 °C.

De acuerdo a Martins, et al., (2005) manifiesta que “una prueba muy importante para considerar una cepa con capacidad probiótica es su resistencia a los jugos gástricos. El cual está compuesto por pH ácidos y concentraciones de cloruro de sodio junto con enzimas catabólicas”. Ramirez-Chavarin, Wachter, Eslava-Campos, & Perez Chabela, (2013) mencionan que “las bacterias destinadas a ejercer efectos beneficiosos en los intestinos deben sobrevivir el tránsito por medio ácido y salino del estómago”. Hoque, et al. (2010) sostiene que en “el experimento

utilizó cloruro de sodio (NaCl) ya que es una sustancia inhibidora que puede inhibir el crecimiento de ciertos tipos de bacterias y es la sal con mayor presencia en el tracto gastrointestinal". Por lo tanto, el mejor tratamiento no será aquel que tenga mayor crecimiento en menor concentración de cloruro de sodio en el medio de cultivo, sino aquel o aquellos que resistan y se reproduzcan a mayor concentración de cloruro de sodio durante el tiempo expuesto a las diferentes temperaturas de incubación.

## 9. CONCLUSIONES

Esta investigación que muestra la presencia de bacterias ácido lácticas en frutos silvestres nativos.

De acuerdo con los análisis fenotípicos las bacterias en estudio fueron clasificadas en dos géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*.

Las cepas en estudio sobreviven y se desarrollan en medios que contienen bilis ya que utilizan los componentes como nutrientes para su crecimiento.

Los resultados del ensayo bioquímico en condiciones ácidas, indican que las cepas tienen la capacidad de sobrevivir en un rango de pH ácido de 2.5 a 4.5; por lo que se concluye que las cinco cepas de estudio

sobrevivirían a las condiciones ácidas extremas en el tracto gastrointestinal.

De acuerdo con los resultados de evaluación del crecimiento a las diferentes temperaturas de incubación, se concluye que las cinco cepas crecen a la temperatura de 37 °C; pero que también crecen a las temperaturas extremas (15 y 45 °C), por lo que indica que las bacterias cumplen un requisito más para ser considerados como probióticos.

En la investigación las cinco cepas en estudio toleran diferentes concentraciones de cloruro de sodio (2-6%) y diferentes temperaturas de incubación (15, 37 y 45 °C), se puede concluir que las cinco cepas sobreviven inclusive a la concentración alta como (6% de NaCl), ya que presentan valores promedios de supervivencia a 15 °C de 7.385 log UFC/ml, a 37 °C de 7.690 log UFC/ml y a 45 °C el valor de 5.413 log UFC/ml siendo valores similares al probiótico comercial; concluyendo que las cinco cepas soportarían la supervivencia tanto en la digestión, en la viabilidad de tratamientos térmicos así como también procesos de producción ya que cumplen con los requisitos imprescindibles a ser considerados microorganismos probióticos.

De acuerdo con los análisis funcionales la cepa denominada UTNFa37 tiene las mejores

características probióticas debido a la alta tolerancia a: ácidos, bilis, temperaturas y cloruro de sodio.

De los resultados del estudio *in vitro* se concluye que las bacterias de interés, presentan características probióticas deseables; demostradas por su capacidad para tolerar la bilis a una concentración fisiológica y altas condiciones ácidas, con lo cual se acepta la Hi: “las cepas aisladas de frutos silvestres nativos tienen capacidad probiótica”.

## 10. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios similares al presente con otras cepas obtenidas de frutos nativos de otros sectores para evaluar sus características probióticas y obtener un banco de microorganismos que puedan ser una valiosa fuente de diversidad genética.

Se recomienda realizar un estudio genotípico para la identificación precisa de las cepas de bacterias a nivel de especie.

Se recomienda determinar la viabilidad de las cepas en estudio a diferente temperatura de almacenamiento, para su futuro uso en la industria farmacológica y alimentaria.

## 11. REFERENCIAS

1. Aguirre Rodríguez, A. C., & Moreno Cardozo, J. H. (2012). Biotechnological

Aspects in the Selection of the Probiotic Capacity of Strains. In A. C. Aguirre Rodríguez, & J. H. Moreno Cardozo, *Probiotics* (pp. 583-598). Colombia: INTECH.

2. Aquihuatl Ramos, M. d., Volke Sepúlveda, T., Prado Barragán, L. A., Shirai Matsumoto, K., Ramírez Vives, F., & Salazar Gonzáles, M. (2012). Manual de prácticas de laboratorio Microbiología general. In M. d. Aquihuatl Ramos, *Manual de prácticas de laboratorio Microbiología general* (pp. 12-78). Meéxico, D.F: Printed in Mexico.

3. De la Rosa Fraile, M., Prieto Prieto, J., & Navarro Marí, J. M. (2011). Microbiología en ciencias de la salud Conceptos y aplicaciones Tercera edición. In M. De la Rosa Fraile, J. Prieto Prieto, & J. M. Navarro Marí, *Microbiología en ciencias de la salud Conceptos y aplicaciones Tercera edición* (pp. 16, 1-47). Barcelona, España: Elsevier España, S.I.

4. Hoque, M. Z., Akter, F., Hossain, K. M., Rahman, M. M., Billah, M. M., & Islam, K. D. (2010). Isolation, Identification and Analysis of Probiotic Properties of Lactobacillus Spp. From Selective

- Regional Yoghurts. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 39-46.
5. Iranmanesh, M., Ezzatpanah, H., Mojgani, N., Karimi Torshizi, M. A., Aminafshar, M., & Maohamadi, M. (2012). Isolation of lactic acid bacteria from ewe milk, traditional yoghurt and sour buttermilk in Iran. *European journal of food research and review*, 79-92.
  6. Martins, F., Ferreira, F., Penna, F., Rosa, C., Drummond, R., Neves, M., & Nicol, J. (2005). Estudio do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces Cerevisiae* a través de testes in vitro. *Revista de Biología e Ciências da terra*, 11(2):79-89.
  7. Pedersen, C., Jonsson, H., Lindberg, E., & Roos, S. (2004). Microbiological characterization of wet wheat distillers grain, with focus on isolation of Lactobacilli with potential as probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 70,1522-1527.
  8. Powthong, P., & Suntornthiticharoen, P. (2013). Anticardiac and probiotic properties of lactic acid bacterial isolated from chicken intestine, entrails of swine, and soil against gastrointestinal and urogenital pathogens. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 1-18.
  9. Ramirez-Chavarin, M. L., Wachter, C., Eslava-Campos, C. A., & Perez Chabela, M. L. (2013). Probiotic potential of thermotolerant lactic acid bacteria strains isolate from cooked meat products. In M. L. Ramirez-Chavarin, *International Food Research Journal* (pp. 991-1000). México: Iztapalapa.
  10. Victoria-León, T., Totosaus, A., Guerrero, I., & Pérez-Chabela, M. L. (2006). Efectos de bacterias ácido lácticas termoresistentes en salchichas cocidas. *CYTA Journal of Food*, 135-141.