

# Atenuación térmica de cultivos lácticos destinados a la maduración acelerada de quesos

MARÍA D. SÁNCHEZ

*Departamento Ciencia de los Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.*

## RESUMEN

En el presente trabajo se evalúa el efecto de la atenuación mediante choque térmico a varias temperaturas de cultivos de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* destinados a la maduración acelerada de queso tipo Dambo. El objetivo fue establecer condiciones adecuadas para el tratamiento térmico, suficiente para reducir la producción de ácido láctico, sin dañar el sistema enzimático proteolítico importante para la maduración del queso. Suspensiones de bacterias se cultivaron a pH constante y se calentaron a 63, 67, 70 y 72°C. Los cambios en el pH y en la actividad enzimática mediante el método del ácido trinitrobenzenosulfónico se evaluaron para cada temperatura de atenuación. Las células calentadas a 70 y 72°C produjeron ácido lentamente después de un período de retraso de 4 horas, mientras que las células calentadas a 65°C lo hicieron rápidamente, con un retraso de 2 horas. Los cultivos calentados a 63°C se comportaron de forma similar al control. La actividad proteolítica disminuyó en 30, 70, 83 y 93% respectivamente, comparada con la de las células sin ningún tratamiento.

## ABSTRACT

The attenuation by heat shocking of *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* strains to be used to accelerate the ripening of Dambo cheese was evaluated. The aim was to establish adequate conditions for heat treatment to sufficiently suppress lactic acid production without damaging the proteolytic enzyme system important for cheese maturation. Suspensions were cultivated at constant pH and heated to 63, 67, 70 and 72°C. Changes in pH and proteolytic activity by the trinitrobenzene sulfonic acid assay were measured for each attenuation temperature. The cells heated to 70 and 72°C liberated acid slowly after a rest period of four hours. The cells heated to

67°C liberated acid rapidly after a rest period of two hours. The cells heated at 63°C behaved similar to the control culture. The proteolytic activity of the suspensions was lowered 30, 70, 83 and 93%, respectively as compared with the control culture.

## PALABRAS CLAVE

Queso, maduración acelerada, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

## AGRADECIMIENTO

Esta investigación fue financiada por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de Los Andes. Se agradece especialmente la colaboración del personal de la Planta de Lácteos Santa Rosa de la Universidad de Los Andes.

## INTRODUCCIÓN

La maduración del queso es un proceso mediante el cual se obtiene una masa homogénea con sabor, aroma y textura característicos, a partir de la cuajada fresca por la acción de las proteinasas de la leche, las enzimas coagulantes, los cultivos iniciadores y otros microorganismos que se desarrollan en el queso. Los costos de operación y almacenamiento durante el período de maduración, largo para algunos quesos, representan una parte importante del costo total de elaboración. Por este motivo se ha prestado especial atención al desarrollo de tecnologías para acelerar la maduración de algunos tipos de queso.

Entre los métodos investigados para acortar el período de maduración se incluyen: aumento de la temperatura de almacenamiento, adición de enzimas exógenas, adición de cultivos iniciadores atenuados y varias combinaciones de estos métodos (El Soda y Pandian, 1991)..

Actualmente se considera que las preparaciones enzimáticas destinadas a potenciar la maduración del

queso, que no incluyan bacterias lácticas o sus enzimas, no proporcionan resultados satisfactorios y se tiende a utilizar células atenuadas, ya sea mediante métodos físicos o manipulación genética.

El empleo de microorganismos modificados con el objeto de acelerar la maduración del queso presenta actualmente numerosas ventajas sobre los métodos tradicionales (El Soda, 1993), así : a) su utilización no presenta problemas legales, b) los microorganismos contienen las enzimas deseadas, e incluso en ocasiones, en la concentración precisa para ciertos tipos de queso, c) las enzimas quedan retenidas y uniformemente distribuidas en el queso tras la lisis celular. Sin embargo, la inoculación de la leche de quesería con concentraciones de células viables superiores a las normales puede conducir a una fermentación de la lactosa anormalmente rápida, lo que da lugar a quesos con bajo pH, elevado contenido en humedad y, con frecuencia, defectos en el sabor. Por lo tanto, se ha de conseguir que las células añadidas a elevados niveles no produzcan ácido láctico y, sin embargo, mantengan activos los sistemas enzimáticos que intervienen en la maduración. Esto se ha conseguido mediante métodos físicos tales como el choque térmico (Ardö y Petterson, 1988; El Abboudi et al., 1991; Exterkate et al., 1987; Frey et al., 1986; Jonson et al., 1995; Petterson y Sjöström, 1975; Vafapaulou et al., 1989), la congelación, la liofilización y el secado por aspersión (Bartels et al., 1987; Jonson y Etzel, 1995; Johnson et al., 1995).

El Albboudi et al. (1991) investigaron las condiciones adecuadas para atenuar térmicamente células de lactobacilos (*Lactobacillus casei-casei*). Utilizaron tres temperaturas (65, 67 y 70°C) durante 22 segundos y midieron tanto la producción de ácido láctico como la actividad proteolítica obteniendo como mejor combinación 67°C por 22 segundos. Para este tratamiento el retardo en la producción de ácido láctico fué de 24 horas mientras el sistema proteolítico redujo su actividad en 37%.

Petterson y Sjöstrom (1975) trabajaron con un cultivo mixto mesófilo compuesto de *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus diacetylactis* y *Leuconostoc citrovorum*, y bacterias iniciadoras termófilas (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus thermophilus*) atenuadas por el calor. A los fines de reducir la producción de ácido láctico del cultivo mixto, se requirió una temperatura mínima de 54°C durante 15 segundos (s) y de 60-63°C (15 s) para los cultivos termófilos. En los estudios de maduración acelerada de queso suizo semiduro con estos cultivos, utilizaron

un choque térmico de 59°C para los cultivos mesófilos y 69°C para las suspensiones de *Lactobacillus helveticus*.

A los efectos de obtener un método económico para producir y distribuir células atenuadas para acelerar la maduración del queso, Johnson y Etzel (1995) utilizaron varios métodos de atenuación de *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32, con el objetivo de demorar la producción de ácido sin reducir la actividad enzimática. Los métodos utilizados fueron : secado por aspersión con temperaturas del aire a la salida de 82 y 120°C, liofilización y congelación. Los resultados demostraron un mejor balance entre la producción de ácido y el mantenimiento de la actividad enzimática en los microorganismos tratados por secado por aspersión a 120°C (temperatura del aire de salida), además de una mayor economía, comparado con la liofilización y la congelación.

El objetivo de esta investigación es estudiar y comparar el efecto del choque térmico a varias temperaturas en la producción de ácido láctico y en la actividad enzimática de cultivos de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Estos cultivos, sometidos a choque térmico, se utilizarán posteriormente para acelerar la maduración del queso tipo Dambo, con un período normal de maduración de tres meses y se analizará la relación de los diferentes tratamientos térmicos sobre las características físico-químicas y sensoriales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Preparación de los cultivos**

Un cultivo mixto termófilo de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (No. 914410, obtenido de Bionics Biotechnologisches Laboratorium, Suiza) se sembró en leche descremada en polvo reconstituída (10% p/v), esterilizada (120°C/10 min) y se almacenó a -30°C. Previo a su utilización se repicó tres veces (2% v/v) en leche en polvo descremada reconstituída (10% p/v), esterilizada (85°C/60 min) y se incubó en estufa a 40°C por 15 horas. A los fines de obtener una elevada carga bacteriana, el cultivo se sembró al 2%v/v en leche en polvo descremada reconstituída estéril (10% p/v) y se incubó a 40°C durante 10 horas, manteniendo el pH constante entre 6,1 y 6,3 mediante neutralización con NH<sub>4</sub>OH, 20% (v/v), adicionado a intervalos de treinta minutos. El crecimiento se detuvo por enfriamiento hasta 5°C. Se realizó un conteo microbiano de células vivas en placa con medio Briggs (Hawakawa, 1992), antes y después del crecimiento.

**2. Tratamiento térmico de las suspensiones de bacterias**

Las suspensiones de bacterias obtenidas del cultivo a pH constante, se sometieron a cuatro tratamientos térmicos con el propósito de atenuar su producción de ácido láctico, calentando hasta 63, 67, 70 y 72 °C respectivamente, en un baño de agua hirviente con agitación continua, y enfriando inmediatamente hasta 32 °C, sumergiéndolas en un baño de agua con hielo. El tiempo de calentamiento hasta la temperatura de tratamiento fué de 3,5-5,0 min. y el de enfriamiento de 2,5-4,0 min. Las suspensiones de bacterias tratadas térmicamente se almacenaron a 5 °C hasta su utilización, en la preparación de quesos al día siguiente. A las mismas, se les realizó un conteo microbiano de células vivas en placa con medio Briggs, después del tratamiento térmico, por duplicado.

**3. Determinación de la producción de ácido láctico.**

Las suspensiones de bacterias tratadas térmicamente se inocularon (1% v/v) en leche descremada reconstituída estéril (10% p/v) y se incubaron a 40 °C. El pH se midió cada 30 minutos (pHmetro Hanna, HI9321). Se incluyó un lote sin ningún tratamiento térmico para fines de comparación.

**4. Determinación de la actividad enzimática.**

La actividad proteolítica de los microorganismos tratados térmicamente se evaluó mediante la determinación de grupos amino (-NH<sub>2</sub>) libres por el método del 2,4,6 ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) (Barton et al., 1993; Mc Kellar, 1981).

Los cultivos tratados térmicamente y un cultivo sin ningún tratamiento térmico se inocularon en leche descremada reconstituída al 2% v/v y se incubaron a 40°C/15 horas. Muestras por duplicado de 2 ml del extracto obtenido por centrifugación de cada suspensión de bacterias y de leche descremada reconstituída se trataron con 4 ml de ácido tricloroacético al 12% p/v, por 20 min a 25 °C, seguido de filtración en papel Whatman 42. Duplicados de 0,2 ml de cada filtrado se mezclaron con 2 ml de solución buffer de borato de sodio 0,1M (pH 9,5) y 0,8 ml de TNBS 1000 mg/ml (Sigma P2297) y se incubaron en la oscuridad a 25 °C por 30 min. También se colocaron en incubación volúmenes iguales de soluciones patrón de glicina (1 - 12 mmoles/ml) tratadas de igual manera pero no filtradas.

Al finalizar el período de incubación se adicionaron, para detener la reacción, 0,8 ml de fosfato sódico 2M conteniendo 18mM de sulfito de sodio y se leyó la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro (Baush & Lomb, Spectronic 20) contra un blanco de agua destilada. Las absorbancias se convirtieron a micromoles de grupos amino libres por mililitro de suspensión mediante una curva patrón. La proteolisis

se expresó como la concentración de grupos amino (-NH<sub>2</sub>) libres solubles en ácido tricloroacético por mililitro de suspensión (Dmmoles/ml).

**5. Tratamiento estadístico de los datos**

Todos los datos se sometieron a un análisis de varianza multifactorial utilizando el programa Statgraphics Plus.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**1. Resistencia térmica de los microorganismos**

El recuento de bacterias lácticas en el cultivo inicial, después del crecimiento a pH constante y después de los tratamientos térmicos aplicados, se muestra en la Tabla 1. El porcentaje de supervivencia fue de 78,9 para el tratamiento térmico de 63 °C, y disminuyó a 0,34 y 0,03 para los tratamientos de 67 y 70 °C, respectivamente, lo cual era de esperarse por la inactivación térmica celular. Se aprecia que la disminución observada se corresponde con la disminución en la producción de ácido y en la actividad enzimática, según se indica mas adelante.

La resistencia térmica de los microorganismos depende de la variedad, condiciones de crecimiento, edad del cultivo, naturaleza del medio de suspensión y condiciones del procesamiento. Entre los diferentes métodos para atenuar por el calor, éste fue seleccionado por ser el mas conveniente en las condiciones de la planta de elaboración de queso, ya que el objetivo principal de atenuar las células fue acelerar la maduración del queso Dambo.

La mortalidad de las células obtenida con el medio Briggs no indica necesariamente que estén muertas, sino que el daño sufrido en la pared celular o membrana no permite que sigan creciendo. Este deterioro puede ser un factor importante en la liberación de su sistema enzimático en la cuajada durante la elaboración del queso (Frey et al., 1986).

**TABLA I. RECUENTO DE STREPTOCOCCUS THERMOPHILLUS Y LACTOBACILLUS BULGARICUS SIN TRATAMIENTO TÉRMICO Y ATENUADOS MEDIANTE TRATAMIENTO TÉRMICO (UFC/ML)<sup>1</sup>**

	Rango	Media	% Supervivencia
Cultivo inicial, 2% v/v	(1,6-10,0)10 <sup>5</sup>	4,7x10 <sup>5</sup>	
Crecimiento a pH cte (6,1-6,3 / 40°C/10h) <sup>2</sup>	(1,2-3,5)10 <sup>8</sup>	1,9x10 <sup>5</sup>	
Tratamiento térmico a 63°C	(2,0-3,0)10 <sup>7</sup>	1,5x10 <sup>7</sup>	78,90
Tratamiento térmico a 67°C	(0,3-15,8)10 <sup>4</sup>	6,5x10 <sup>4</sup>	0,34
Tratamiento térmico a 70°C	(1,3-11,0)10 <sup>3</sup>	5,7x10 <sup>3</sup>	0,03
Tratamiento térmico a 72°C	-----	-----	<0,03

<sup>1</sup> Resultados del análisis por duplicado de tres experimentos.

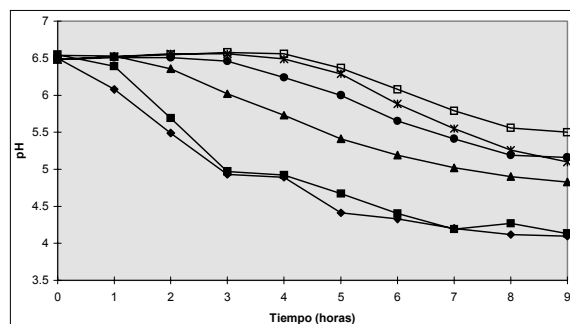
<sup>2</sup> Cultivo sin tratamiento térmico.

## 2. Producción de ácido láctico

El efecto del tratamiento térmico a diferentes temperaturas en la producción de ácido láctico de las suspensiones mantenidas a 40 °C se muestra en la Figura 1. Se observa que las células calentadas a 70 y 72 °C produjeron ácido lentamente después de un período de retardo de 4 horas. La producción de ácido fue más rápida, con un retraso de 2 horas para los microorganismos tratados a 65 °C. Los microorganismos tratados a 63 °C se comportaron de forma similar al control, sin tratamiento térmico. Después de 9 horas de mantenimiento de las suspensiones a 40 °C, el pH disminuyó hasta 4.13, 4.83, 5.19, 5.26 y 5.56 para los tratamientos de 63, 65, 67, 70 y 72 °C respectivamente, y 4.10 para el control.

Es importante no perturbar la acidificación de la leche iniciada por los microorganismos iniciadores hasta que la mayor parte de la lactosa sea fermentada. En el queso Cheddar se requieren aproximadamente 9 horas (Rollema et al., 1989). Petterson y Sjoström (1975) reportaron un tiempo de 5-10 horas para llegar a pH 5,5 en la producción de ácido láctico de suspensiones de streptococcus y lactobacilos cultivados a pH constante y calentados entre 59 y 69 °C durante 15 segundos, lo cual fue suficiente para la elaboración de queso suizo semiduro. El Abboudi et al. (1991) trabajaron con *Lactobacillus casei-casei*, obteniendo un retardo de 24 horas en la producción de ácido láctico para los microorganismos tratados a 67 °C.

## 3. Actividad enzimática



**FIGURA 1.** Efecto del tratamiento térmico a varias temperaturas en la producción de ácido de las suspensiones de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*: control, sin tratamiento (♦), 63°C (■); 65°C (▲); 67°C (●); 70°C (★); 72°C (○). Cada punto es la media de tres experimentos.

La actividad proteolítica total de las suspensiones de microorganismos medida mediante el método del ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) y expresada en mmoles/ml de grupos amino (-NH<sub>2</sub>) libres, a las 24 horas del tratamiento térmico, se muestra en la Tabla 2. Se aprecia una reducción en la actividad proteolítica

de 30, 70, 83 y 93 %, para los tratamientos de 63, 67, 70 y 72 °C, respectivamente, comparada con las células sin ningún tratamiento.

El Abboudi et al. (1991) obtuvieron una reducción de la actividad proteolítica total medida por el método Hide Powder Azure de 25, 37 y 45% en *Lactobacillus casei casei* calentados a 65, 67 y 70 °C, respectivamente. Petterson y Sjöström (1975) reportaron entre 10 y 30% de disminución en la actividad proteolítica en células calentadas por impacto térmico a 60 °C durante 15 segundos, utilizando el método de Hull (1947) modificado (reactivo Folin & Ciocalteu)

La diferencia en la resistencia al calor de las enzimas proteolíticas podría explicarse en los diferentes productos analizados. El método de Hull modificado mide aminoácidos aromáticos, mientras que el método TNBS mide grupos amino (Kwan et al., 1983; Rollema et al., 1989). Cuando el principio de los métodos analíticos es diferente no es apropiada una comparación directa. El método de HPA mide la actividad proteolítica como una variación de la absorbancia a 593 nm. En un estudio comparativo de métodos para detectar proteólisis en leche, Rollema et al. (1989), observaron baja sensibilidad en el método HPA y no encontraron una relación directa entre la actividad proteolítica y la concentración enzimática.

El objetivo de este estudio fue determinar un tratamiento térmico adecuado que retardara la producción de ácido láctico de la suspensión de células sin dañar el importante sistema enzimático necesario para la maduración del queso. Las células tratadas térmicamente pueden añadirse a la leche antes de la adición del cuajo. El daño causado a la pared celular por el calor aumentaría la lisis celular causando mayor proteólisis y peptidólisis que las células vivas (Ardö et al., 1989). La adición de células tratadas térmicamente al queso tiene también la ventaja de suplementar con sistemas enzimáticos completos incrementando el potencial proteolítico y permitiendo una degradación balanceada de la caseína. Este balance es de gran importancia en la eliminación de péptidos amargos liberados por la acción del cuajo y proteasas bacterianas sobre la caseína, ya que las células son una fuente suplementaria tanto de proteasas pero también de peptidasas. Las últimas pueden hidrolizar los péptidos grandes responsables del sabor amargo en péptidos más pequeños y aminoácidos (Lemieux y Simard, 1991). La adición de lactobacilos tratados térmicamente también permite la adición simultánea de otros sistemas enzimáticos responsables de la conversión de los productos de la proteólisis en compuestos del sabor.

**TABLA II. EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO A VARIAS TEMPERATURAS EN LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE SUSENSIONES DE STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS Y LACTOBACILLUS BULARICUS<sup>1</sup>**

Tratamiento	Actividad proteolítica (µmoles/ml)	Disminución de la actividad proteolítica (µmoles/ml)
Control (sin tratamiento)	8,57	
63 °C	6,00	30
67 °C	2,57	70
70 °C	1,45	83
72 °C	0,60	93

<sup>1</sup> Resultados del análisis por duplicado de tres experimentos.

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La producción de ácido láctico fue retardada considerablemente con los tratamientos térmicos a 70 y 72 °C, por lo tanto, se recomienda ensayar estos cultivos en los estudios de maduración acelerada de queso tipo Dambo. A pesar de observarse una considerable disminución de la actividad enzimática para estos tratamientos, la lisis celular debida al choque térmico probablemente permitiría la liberación de las proteasas y peptidasas durante el período de maduración.

Se recomienda realizar estudios de atenuación térmica con otras variedades de microorganismos, en especial con *Lactobacillus helveticus* por los buenos resultados obtenidos en la aceleración de la maduración de diversos tipos de queso.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ardö Y. y Pettersson, H.E. **Accelerated cheese ripening with heat treated cells of *Lactobacillus helveticus* and a commercial proteolytic enzyme.** J. Dairy Res. 55 :239-245. 1988.

Ardö Y., Larson, P.O., Mansson, H.I. y Hedenberg, A. **Studies of peptidolysis during early maturation and its influence on low-fat cheese quality.** Milchwissenschaft 44:485-490. 1989.

Bartels, H. J., Johnson, M.E. y Olson, N.F. **Accelerated ripening of Gouda cheese. 2. Effect of freeze-shocked *Lactobacillus helveticus* on proteolysis and flavor development.** Milchwissenschaft 42 :139-146. 1987.

Bouton, Y., Guyot, P., Dansen, A. y Grappin, R. **Activité protéolytique de souches de lactobacilles thermophiles isolées de levains et de Comté. I. Validation sur minifromages des techniques de laboratoire.** Lait, 73 :265-279. 1993.

El Abboudi, M., Pandian, S., Trépanier, G., Simard, R.E. y Lee, B.H. **Heat-shocked *lactobacilli* for**

**acceleration of Cheddar cheese ripening.** J. Food Sci. 56 :948-953. 1991.

El Soda, M. y Pandian, S. **Recent developments in accelerated cheese ripening.** J. Dairy. Sci. 74:2317-2335. 1991.

El Soda, M.A. **The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening.** FEBS Microbiol Rev. 12: 239-246. 1993.

Exterkate, F. A., de Veer, G.J. y Stadhouders, J. **Acceleration of the ripening process of Gouda Cheese by using heat-treated mixed-strain starter cells.** Neth. Milk Dairy J. 41 :307-312. 1987.

Frey, J. P., Marth, E.H., Jonson, M.E. y Olson, N.F. **Heat and freeze-shocking cause changes in peptidase and protease activity of *Lactobacillus helveticus*.** Milchwissenschaft 41: 681-686. 1986

Hayakawa, K. **Classification and actions of food microorganisms - With particular reference to fermented foods and lactic acid bacteria.** En: Nakazawa, Y y A. Hosono. Functions of fermented milk. Elsevier Applied Science. USA. Cap 7 : 127-163. 1992.

Hull, M. E. **Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk.** J. Dairy Sci. 30:881-884. 1947.

Johnson, J.A.C. y Etzel, M.R. **Properties of *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 attenuated by spray-drying, freeze-drying, or freezing.** J. Dairy Sci. 78 :761-768. 1995.

Johnson, J.A.C., Etzel, M.R., Chen, C.M. y Johnson, M.E. **Accelerated ripening of reduced fat Cheddar cheese using four attenuated *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 adjuncts.** J. Dairy Sci. 78 :769-776. 1995.

Kwan, K.K.H., Nakai, S. y Skura, B.J. **Comparison of four methods for determining protease activity in milk.** J. Food Sc. 48: 1418-1421. 1983.

Lemieux, L. y Simard, R.E. **Bitter flavour in dairy products. I. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture.** Lait 71:599-636. 1991.

Mc Kellar, R.C. **Development of off-flavors in ultra-high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis.** J. Dairy Sc. 64 :2138-2145. 1981.

Pettersson, H.E. y Sjöström, G. **Accelerated cheese ripening: a method for increasing the number of lactic starter bacteria in cheese without detrimental effects to the cheese-making process, and its effect on the cheese ripening.** J. Dairy Res. 42 :313-326. 1975.

Rollema, H.S., McKellar, R.C., Sorhaug, T., Suhren, G., Zadow, J.G., Law, B.A., Poll, J.K., Stepaniak, L y Vagias, G. **Comparison of different methods for the detection of bacterial proteolytic enzymes in milk.** Milchwissenschaft. 44:491-496. 1989.

Vafapoulou, A., Alichanidis, E. y Zerfiridis, G. **Accelerated ripening of Feta cheese, with heat-shocked cultures or microbial proteinases.** JK. Dairy Res. 56 :285-296. 1989.