

RÉDUCTION CHEZ LE PORC EN CROISSANCE DE LA SUPPLÉMENTATION EN PHOSPHORE MINÉRAL PAR L'UTILISATION DE CÉRÉALES À ACTIVITÉ PHYTASIQUE ÉLEVÉE

A. POINTILLART (1) Colette COLIN (1), Claire LACROIX (1), J. RADISSON (2)

(1) I.N.R.A. - Laboratoire de Nutrition et Sécurité Alimentaire, 78352 Jouy-en-Josas Cédex

(2) Ralston Purina International - 13, Excelsior laan, 1930 Zaventem, Belgique

avec la collaboration de J.C. BERNARDIN, B. CAYRON, D. BESNARD et H. ROY (INRA, Jouy-en-Josas),
de J. Van EYS et G. BOURLLOT (Ralston Purina France, Saint Quentin en Yvelines)

Blé, triticale et seigle (et leurs sous-produits) présentent une activité phytasique élevée permettant une meilleure utilisation du phosphore phytique par le porc au point d'envisager la suppression complète de l'addition de P minéral. Aussi, les effets sur la minéralisation osseuse de la suppression graduelle de l'apport de P minéral ont été étudiés chez des porcs en croissance recevant des apports de P total conformes aux recommandations et des régimes présentant une plus ou moins forte activité phytasique. 24 porcs LW pesant 28 kg et âgés de 10 semaines ont été répartis en 4 lots correspondant à 4 régimes (A, B, C, D) isophosphoriques (0,6% de P total) contenant des proportions décroissantes de P minéral (phosphate bicalcique): 30 (A), 20 (B), 10 (C) et 0% (D) de P total et des activités phytasiques différentes : 0,2 (A), 0,9 (B et C), et 1,9 (D) UI/g d'aliment. Après 2 mois d'alimentation, semi-ad libitum et appariée, les animaux ont été abattus, des prélèvements osseux (tibias, métatarsiens) ont servi à déterminer la teneur en cendres ainsi que la résistance à la rupture (moment de flexion). Les 4 groupes de porcs ont présenté des performances identiques (GMQ moyen : 928 g/jour). A l'abattage, la calcémie, la phosphatémie, la phosphatasémie n'étaient pas affectées par la nature des apports de P. Les moments de flexion des métatarsiens et des tibias étaient identiques pour les 4 lots de même que la teneur en cendres (rapportée à la MS ou au volume osseux) des métatarsiens. Ces résultats suggèrent qu'un régime à forte activité phytasique et dépourvu de supplémentation minérale de P (D) pouvait assurer des performances et une minéralisation osseuse comparables à celles observées avec un régime à faible activité phytasique contenant une forte proportion de P minéral (A). Cela permet d'envisager des économies de phosphore et donc, une diminution des rejets en cet élément. Les problèmes liés à la détermination de l'activité phytasique et à sa conservation sont abordés.

Reduced dicalcium phosphate supplementation in growing pigs by using phytase-rich cereals and by-products.

In pigs, cereals that contain phytase, such as wheat, triticale, rye or their by-products, lead to better plant P (2/3-3/4 phytic) utilization. This is mainly demonstrated in pigs given P-deficient diets. We therefore studied bone mineralization (ash contents and breaking strength) in growing pigs given normal, isophosphorus (0.6% P total) diets which contained decreasing inorganic (dicalcium phosphate) P amounts and increasing phytase activities. The dietary phytase was provided by altering the dietary proportions of wheat, wheat by-products (bran and shorts) and rye-bran. Twenty-four 10-week old LW pigs weighing 28 kg BW were assigned to 4 dietary treatments (A, B, C, D) which contained the following proportions of inorganic P : 30 (A), 20 (B), 10 (C) and 0 (D) as percentage of total P. Phytase activities were 0.2 (A), 0.9 (B and C) and 1.9 (D) IU/g feed, respectively. Animals were pair-fed over 2 months then killed to collect bone and plasma samples. The tibia and metatarsal bones were used to measure bending moment (at fracture point). Apparent density (weight/volume) and ash (total, % bone dry matter or volume) contents were determined on the tibia. Pig slaughter weights, average daily gain (overall mean 928 g/day) and feed-to-gain ratio were identical among the 4 groups. At slaughter, there was no effect of the kind of phosphorus given on plasma values of Ca, inorganic P and alkaline phosphatase. All the bone parameters were identical among the 4 groups. These results suggest that a normal P phytase-rich diet without added inorganic P, such as diet D, leads to general performance and to bone mineralization equal to those on a low-phytase diet containing 30% of its total P as dicalcium phosphate, such as diet A. This reduced inorganic P supplementation could save money and if regulations or restrictions are developed limiting the amount of P allowed in the excreta, the use of rich-phytase cereals and by-products might be encouraged, moreover this procedure is simple and low-costing.

INTRODUCTION

L'ensemble des résultats acquis sur l'utilisation des phytates montre que le blé ou d'autres céréales (triticale, seigle), bien pourvues en activité phytasique, permettent une absorption plus élevée du phosphore que celle obtenue avec le maïs, céréale dépourvue d'activité phytasique (POINTILLART et al., 1984, 1987 ; POINTILLART, 1991). Cette amélioration de l'absorption du phosphore, conduit à une minéralisation osseuse plus élevée, évaluée en terme de résistance à la rupture ou en terme de contenu en minéraux (POINTILLART, 1991 ; POINTILLART et al., 1987). Par conséquent, il serait envisageable d'économiser tout ou partie de l'apport complémentaire de P minéral en utilisant des régimes à haute activité phytasique tels que ceux constitués à partir de blé ou d'issues de blés (sons, remoulages) ou éventuellement d'autres issues de céréales (son de seigle) ; cela à condition de permettre une minéralisation osseuse au moins égale à celle observée avec les régimes normalement supplémentés en phosphore minéral. Cela restait à démontrer car les essais cités ont été réalisés dans des conditions limites d'apport de P conduisant, la plupart du temps, à une déficience en phosphore.

Le but poursuivi était à la fois d'économiser sur l'apport, **coûteux**, de P minéral en valorisant davantage le P végétal, abondant dans les matières premières utilisées pour l'alimentation des monogastriques, et de diminuer les rejets, dans les lisiers, du phosphore mal utilisé (c.a.d. non retenu par l'animal). Ce but est comparable à celui d'autres équipes, en Hollande (SIMMONS et al., 1990) ou aux Etats-Unis (CROMWELL, 1991) qui, en utilisant une phytase microbienne (*Aspergillus Niger*), obtiennent une amélioration de l'utilisation du phosphore phytique. Toutefois, la procédure que nous proposons à l'avantage d'éviter les problèmes liés au coût et à la conservation de cette phytase exogène en s'appuyant sur les matières

premières disponibles en France, notamment le blé. Les problèmes liés à la conservation de l'activité phytasique au cours de la granulation (JONGBLOED et KEMME, 1990) seront également abordés.

1. PROTOCOLE

24 porcs L.W. âgés de 70 jours, pesant en moyenne 28 kg, ont été répartis en 4 lots de 6. Les animaux ont reçu pendant 2 mois (61 jours) de façon semi-ad libitum et appariée, les aliments expérimentaux (A, B, C et D) puis ont été abattus. Du sang a été prélevé pour déterminer la calcémie, la phosphatémie, la phosphatasémie (phosphatase alcaline) ainsi que des os (tibias, métatarsiens) pour mesurer plusieurs paramètres statiques (poids, longueur, diamètre), dynamiques (résistance à la rupture) ou biochimiques (cendres, densité apparente, cendres relatives au volume ou à la matière sèche de l'os). Toutes les méthodes de mesures ont été décrites précédemment (POINTILLART et al., 1987).

Les 4 régimes ont été composés (RALSTON PURINA France a fourni les matières premières préalablement analysées à l'INRA) de proportions variables des matières premières suivantes : maïs (Y corn meal), tourteau de soja (ML 47), blé, remoulages, son de blé, farine basse de riz et pour le régime D, également de son de seigle (tableau 1). Les caractéristiques principales sont décrites dans le tableau 2, les apports de Ca et de P total des 4 régimes étaient identiques et conformes aux recommandations INRA (GUEGUEN et PEREZ, 1981). Les proportions de P minéral (phosphate bicalcique) étaient de 30, 20, 10 et 0 % de P total, pour A, B, C et D respectivement. Le phosphore phytique des régimes a été analysé, il était respectivement de 0,27, 0,34, 0,41 et 0,46% pour A, B, C et D. La croissance a été suivie hebdomadairement.

Tableau 1 - Principales matières premières entrant dans la composition des régimes (%)

Régime	A	B	C	D
Maïs	69	19	-	-
Blé	-	32	35	20
T. soja 47	19	11	9	8
Fleural	0,3	-	40	34
Remoulage	-	23	0,1	12
Son de blé	5	10	5	9
Son de seigle	-	-	-	10
F. basse de riz	3	-	8	1

Aliments formulés par Ralston Purina France, fabriqué à l'APAE (INRA-Jouy). CMV fournis par Ralston Purina France. Chiffres arrondis.

Tableau 2 - Composition minérale des régimes

Aliment	A	B	C	D
P total, %	0,6	0,6	0,6	0,6
dont P minéral, %	0,18	0,12	0,06	0
Ca, %	0,9	0,9	0,9	0,9
Phytase (UI/g)	0,2	0,9	0,9	1,9

P minéral : P bicalcique à 16,5% de P (analysé). Ces régimes avaient des contenus similaires en protéines, énergie, minéraux et vitamines (Vit.D: 1400 UI/kg).

2. RÉSULTATS

2.1. Aliments et activité phytasique

La teneur en Ca a varié de 0,83 à 0,97%, celle de P de 0,59 à 0,63%, suivant les analyses et les fabrications. L'effet de la granulation sur l'activité phytasique a été testé 2 fois (tableau 3). La granulation a été faite après conditionnement à la vapeur ; avant pressage, la température a oscillé entre 35 et 45°C, à la sortie de presse la température maximale atteinte a été de 61°C (presse Buhler, filière 4,8 mm, longueur des canaux : 38 mm). Dans ces conditions, la granulation n'a pas eu d'effet significatif sur l'activité phytasique ; l'examen des écarts extrêmes montre également que la mesure de cette activité enzymatique est imprécise (chaque échantillon de granulé ou de farine a été mesuré 4 fois).

L'examen du tableau 4 suggère une grande variabilité de l'activité phytasique des ingrédients utilisés en fonction de leur provenance. Cela était particulièrement flagrant pour le son de seigle dont l'activité allait de 2 à 8 en fonction de l'année de provenance, celle du remoulage variant presque du simple au double. L'absence d'effet significatif de la granulation permettait d'évaluer l'activité phytasique de l'aliment granulé à partir de ses composantes (tableau 5). Parallèlement, dans cet essai, l'effet de la température, liée au passage dans la filière, a été testé sur la granulation d'un remoulage, d'un blé broyé et d'un son fin. Les températures de sortie de filière, respectivement de 46°C et 62°C pour le remoulage et le blé, n'altéraient pas l'activité initiale, mesurée avant la filière, tandis que le passage du son fin entraînait un échauffement considérable (80 à 95°C) réduisant de 85 à 95% l'activité initiale de la phytase.

Tableau 3 - Granulation et activité phytasique (UI/g)

Fabrication	1 (200 kg)		2 (400 kg)		3 (350 kg)	Écart extrême
	F	G	F	G	G	
A	0,2	0,2	0,05	0,09	0,3	0,03-0,3
B	0,8	0,8	0,7	0,8	1,2	0,6 -1,3
C	0,8	0,9	0,8	1,0	1,1	0,7 -1,1
D	1,6	1,9	1,9	2,0	2,1	1,5 -2,3

F : farine G : granulé, 1 UI = 1 µmole de P hydrolysé (phytate de Na) à 37°C (pH 5,6) par mn (dosage adapté de BITAR et REINHOLD, 1972)

Tableau 4 - Variations de l'activité phytasique (UI/g) des principales matières premières utilisées

Provenance (1)	Échantillonnage 89			Échantillonnage 90		
	1	2	3	1	2	3
Son de seigle	2,3	2,5	2,6	8,1	8,1	6,5
Son de blé	1,7	1,4	1,4	1,7	2,3	2,4
Blé	1	0,7	0,6	0,7	0,7	-
Remoulage 1/2 blanc	1,6	1,5	1,8	2,7	1,7	-

Les autres matières premières, farine basse de riz, tourteau de soja et maïs, présentaient une activité phytasique faible ou négligeable comprise entre 0,1 et 0,25 U.

(1) 2 séries d'échantillonnages ont été réalisées, à 2 ans d'intervalle, chaque numéro correspondant à une provenance particulière.

Tableau 5 - Comparaison des activités phytasiques, mesurée et calculée (1) (UI/g)

Aliment	A	B	C	D
Activité mesurée	0,2	0,9	0,9	1,9
Activité calculée	<0,1	1,0	1,0	2,0

(1) Le calcul a été fait à partir des dosages enzymatiques réalisés sur chaque ingrédient pondéré par son pourcentage d'incorporation dans la formule de l'aliment composé.

2.2. Performances (tableau 6)

Il n'y a eu aucun effet significatif du régime sur les divers paramètres se rapportant aux performances, lesquelles pouvaient être considérées comme excellentes.

2.3. Paramètres plasmatiques (tableau 7)

La calcémie, la phosphatémie, la magnésémie et la phosphatasémie ne se distinguaient pas significativement d'un régime à l'autre. L'absence de différence entre les phosphatémies et le fait qu'elles aient été normales suggèrent que les proportions variables de P minéral et végétal des régimes n'ont pas joué et que les porcs n'étaient pas carencés en phosphore.

2.4. Paramètres osseux

Les principaux résultats concernant les mesures de contenu en cendres (cendres totales ou cendres rapportées à la matière sèche ou au volume osseux), de résistance à la rupture (exprimée en terme de moment de flexion) et de densité apparente (poids frais/volume apparent), rapportés dans le tableau 8a, montrent que les divers régimes aboutissaient à une minéralisation comparable des tibias. En outre, ni le diamètre extérieur moyen, ni la longueur moyenne des tibias (données non montrées) n'étaient différents d'un lot à l'autre. De même, aucun des paramètres osseux mesurés sur les métatarsiens (tableau 8b) ne permettait de déceler une différence significative entre les lots.

Tableau 6 - Performances zootechniques

Lot	PV Kg	Ingéré moyen Kg/j	GMQ Kg/j	IC	Rendement Carcasse (%)
A	86,6 ± 1	2,49	0,96 ± 0,02	2,59 ± 0,04	76 ± 0,6
B	83,9 ± 2,7	2,41	0,91 ± 0,05	2,71 ± 0,13	76 ± 0,8
C	85,4 ± 2	2,47	0,92 ± 0,03	2,69 ± 0,09	76 ± 0,7
D	83,4 ± 1,2	2,46	0,92 ± 0,02	2,66 ± 0,09	76 ± 0,7

P.V. : poids vif à l'abattage, $x \pm$ écart type des moyennes, $n=6$, aucun écart significatif

Tableau 7 - Paramètres plasmatiques

Lot	Ca	P	Mg	P.A.
A	10,8 ± 0,4	8,6 ± 0,2	1,5 ± 0,09	81 ± 6
B	10,9 ± 0,4	8,8 ± 0,6	1,6 ± 0,08	68 ± 10
C	11,0 ± 0,2	9,0 ± 0,3	1,6 ± 0,05	79 ± 8
D	11,0 ± 0,4	8,7 ± 0,3	1,6 ± 0,05	74 ± 8

Ca, P, Mg : mg/100 ml, P.A., phosphatase alcaline : UI/l

Tableau 8 - Paramètres osseux

8 a Tibias gauches

Lot	Poids g	Densité g/cm ³	M.F Nxm	Cendres		
				g/os	%MS	g/100 cm ³
A	160 ± 5	1,17 ± 0,01	53 ± 2	43 ± 0,9	47 ± 1,0	31 ± 1,0
B	155 ± 8	1,19 ± 0,02	51 ± 2	41 ± 1,3	47 ± 0,4	31 ± 1,2
C	158 ± 4	1,17 ± 0,01	51 ± 1	42 ± 0,8	47 ± 0,5	31 ± 0,3
D	152 ± 3	1,18 ± 0,01	56 ± 2	41 ± 1,7	48 ± 0,6	32 ± 1,4

M.F. : moment de flexion calculé suivant la formule $MF = FxL/4$ où F = force nécessaire à rompre l'os (en Newton), celui-ci reposant (au milieu de sa diaphyse) sur 2 points (test de flexion «3 points») distants de L (en mètres) (d'après CRENSHAW et al., 1981)

8 b Métatarsiens

Lot	Poids, g	L, mm	D, mm	MF, Nxm
A	28 ± 0,6	81,4 ± 0,8	15,4 ± 0,5	8,1 ± 0,3
B	27 ± 1,1	80,7 ± 1,0	15,2 ± 0,5	8,3 ± 0,3
C	27 ± 0,8	81,3 ± 0,9	14,9 ± 0,5	8,4 ± 0,3
D	26 ± 0,5	80,7 ± 0,9	14,7 ± 0,5	8,5 ± 0,5

L : longueur (distance entre les sommets des 2 épiphyses distale et proximale), D : diamètre externe moyen mesuré selon 2 axes perpendiculaires au milieu de la diaphyse.

Moyenne des valeurs mesurées sur les deux métatarsiens principaux (pied gauche), $X \pm$ SEM ($n=6$)

3. DISCUSSION

Que les régimes aient contenu plus ou moins de P minéral ou de P végétal, les performances et les paramètres relatifs au métabolisme osseux et minéral étaient pratiquement identiques. Cela suggère fortement que l'utilisation du phosphore (et donc sa disponibilité) était voisine d'un lot à l'autre, d'autant que l'apport de P total était identique. Le régime A, par exemple, le plus riche en P minéral (30% du total, proportion assez courante en élevage) et présentant une activité phytasique faible voire négligeable, était très proche des régimes «maïs-soja» classiques et peut donc être considéré comme un régime témoin ou normal. Les 3 autres régimes à forte ou très forte activité phytasique, plus pauvres en P minéral voire complètement dépourvus (régime D) ont permis une minéralisation osseuse comparable à celle obtenue avec le régime témoin et des performances identiques. Les résultats obtenus avec le régime D, sans ajout de phosphate bicalcique, à très haute activité phytasique, montrent que l'on peut se dispenser de P minéral en utilisant des matières premières dont le P végétal est bien utilisable grâce à la présence de blé et de sous-produits du blé (3/4 des constituants) et de son de seigle (10% dans ce régime).

La comparaison des régimes B, P minéral 20% de P total, et C, P minéral 10% de P total, suggère que les besoins en P étaient largement couverts. En effet, à supposer que le régime B ait contenu davantage de P disponible que le régime C, les activités phytasiques étant égales par ailleurs, il n'a conduit ni à une minéralisation, ni à une résistance à la rupture des os supérieures à celles observées avec le régime C. Si le besoin en P disponible avait été insuffisamment couvert avec le régime C (a fortiori avec le régime D) le régime B aurait dû engendrer une différence, ce qui n'était pas le cas. L'absence de différences de minéralisation osseuse entre le régime D, à forte activité phytasique et dépourvu de phosphate bicalcique, et le régime A, le plus riche en ce phosphate et à faible (voire négligeable) activité phytasique, montre clairement que cette enzyme peut suppléer à la supplémentation de P minéral en valorisant P végétal. Ce résultat confirme tous nos précédents travaux ainsi que ceux de CROMWELL (1991) et de SIMONS et al. (1990) qui en incorporant une phytase microbienne (entre 500 et 1000 U/kg) économisent 25 à 30% des apports de P total. L'avantage, essentiellement économique, de notre méthode est double : elle n'introduit pas de surcoût (celui de la phytase ajoutée, produite par génie génétique) et elle réduit le coût de l'aliment, puisque l'on supprime le phosphate bicalcique dont le prix est élevé. L'inconvénient principal qui subsiste concerne les incertitudes entourant l'estimation de l'activité phytasique des matières premières végétales, notamment en raison de sa grande variabilité (tableau 4). Cela rend difficile des possibilités de prédiction d'activités au moins tant qu'un criblage systématique n'aura pas été accompli. Il n'est pas non plus toujours possible d'évaluer l'activité phytasique de l'aliment à partir de ses composantes (POINTILLART, données non publiées, LATIMIER et POINTILLART, JRP 93), comme cela a été le cas dans cet essai ; cela dépend vraisemblablement des conditions de fabrication. Ces conditions ont été contrôlées et homogènes, tout au long des fabrications ce qui explique peut être

l'identité des valeurs obtenues par calcul et par dosage. Les effets de la température ont une importance considérable, les observations réalisées ici s'accordent avec celles, classiques, indiquant une température critique située entre 65 et 75°C pour la phytase du blé, sa dégradation variant aussi avec la durée d'exposition à la chaleur (cf. FOURDIN, 1984). En fait, les processus d'inactivation de l'enzyme au cours de la fabrication sont insuffisamment connus et le problème est le même qu'il s'agisse de l'enzyme contenue dans les céréales ou de l'enzyme microbienne ajoutée. Pour cette dernière, une proportionnalité entre l'activité phytasique et la disponibilité de P a été mise en évidence, entre 0 et 1000 U de phytase/kg, avec un plateau au-delà, chez les poulets de chair (SIMONS et al., 1990) et chez le porc, la résistance à la rupture de l'os augmente lorsque la phytase varie de 500 à 1000 U/kg (CROMWELL, 1991). On pourrait en déduire que, dans le présent essai, cette activité se situant entre 1000 et 2000 U/kg environ, le plateau avait été atteint, justifiant l'absence d'écart de minéralisation (et de résistance à la rupture) entre les lots B, C et D. Ainsi, le régime D présentait une activité phytasique d'environ 2000 U/kg, double de celle du régime C sans entraîner une minéralisation osseuse supérieure à ce dernier, avec pourtant un contenu de P végétal assez proche (0,54 vs 0,60%). Comparé au régime A, maïs-soja essentiellement, les régimes B, C et D, composés pour plus des 2/3 de blé et d'issues de blés ont permis une épargne de 33% (B) à 100% (D) de P minéral. Cette réduction est égale ou supérieure à celles obtenues, chez des porcs en croissance-finition, en utilisant des régimes comparables (LATIMIER et POINTILLART, 1993) ou par incorporation de phytase exogène (SIMONS et al., 1990 ; CROMWELL, 1991).

CONCLUSIONS

L'utilisation de matières premières à haute activité phytasique telles que le blé, le son de blé, les remoulages, le son de seigle, peut largement permettre d'économiser sur l'apport de P minéral. Ce dernier peut dans certains cas être complètement supprimé sans amoindrir les performances et sans danger pour la résistance à la rupture des os.

Dans le présent essai, aucun problème de dégradation de l'activité phytasique des constituants des aliments au cours de leur fabrication n'a été observé, contrairement à ce qui peut l'être parfois. Ce point, de la plus haute importance, mérite d'être confirmé et approfondi avant d'envisager une généralisation des formules employées au cours de cet essai.

Aucun des paramètres mesurés ne permet de penser à l'existence d'un trouble du métabolisme phosphocalcique et osseux dans cet essai et les performances étaient excellentes (GMQ > 900 g/j).

REMERCIEMENTS

Nous remercions la Société RALSTON PURINA FRANCE dont le support financier a permis la réalisation de cette étude. Notre reconnaissance va également à L. GUEGUEN pour les conseils prodigués tout au long de ce travail.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BITAR K., REINHOLD J.G., 1972. *Biochim. Biophys. Acta*, 268, 442-452.
- CRENSHAW T.D., PEO E.R., LEWIS A.J., MOSER A.D., OLSON D., 1981. *J. Anim. Sci.*, 52, 1319-1329.

- CROMWELL G.L. 1991. Feedstuffs (oct.7) 14-16.
- FOURDIN A., 1984. Mémoire de DEA, 18 pp., INRA, Jouy-en-Josas.
- GUEGUEN L., PEREZ J.M., 1981. Proc. Nutr. Soc., 40, 273-278.
- JONGBLOED A.W., KEMME P.A., 1990. Anim. Feed Sci. Technol., 28, 233-242.
- LATIMIER P., POINTILLART A., 1993. Journées de la Recherche Porcine en France, 25., 277 - 286.
- POINTILLART A., 1991. J. Anim. Sci., 69, 1109-1115.
- POINTILLART A., FONTAINE N., THOMASSET M., 1984. Nutr. Rep. Intl., 29, 473-483.
- POINTILLART A., FOURDIN A., FONTAINE N., 1987. J. Nutr., 117, 907-913.
- SIMONS P.C., VESTEEGH H.A., JONGBLOED A.W., KEMME P.A., SLUMP P., BOS K.D., WOLTERS M.G., BEUDEKER R.F., VERSCHOOR G.J., 1990. Brit. J. Nutr., 64, 525-540.