

# CARATTERIZZAZIONE METABOLOMICA DEL COLOSTRO DI TRE RAZZE DI SCROFE E ANALISI DELLA SUA INFLUENZA SULLE PERFORMANCE DI CRESCITA E SOPPRAVVIVENZA DEI SUINETTI

## *METABOLOMICS CHARACTERIZATION OF COLOSTRUM IN THREE SOW BREEDS AND ITS INFLUENCES ON PIGLETS' SURVIVAL AND LITTER GROWTH RATES*

PICONE G.<sup>1\*</sup>, ZAPPATERRA M.<sup>1\*</sup>, LUISE D.<sup>1\*</sup>, TRIMIGNO A.<sup>1</sup>, CAPOZZI F.<sup>1</sup>,  
MOTTA V.<sup>1</sup>, DAVOLI R.<sup>1</sup>, NANNI COSTA L.<sup>1</sup>, BOSI P.<sup>1</sup>, TREVISI P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari - Università di Bologna, 40127,  
Bologna, IT*

\*Gli autori hanno contribuito equamente alla ricerca

**Parole chiave:** *Colostro, <sup>1</sup>H-NMR-spettroscopia, Metaboloma, Razza, sopravvivenza suinetti*  
**Keywords:** *Colostrum, <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy, Metabolome, Pig breed, Piglets survival*

### RIASSUNTO

Il colostro è la prima secrezione della ghiandola mammaria, secreto già nelle ore precedenti il parto e nei 2-3 giorni successivi. Differisce per composizione dal latte e rappresenta per il suinetto la principale fonte di immunità passiva, composti prebiotici e fattori di crescita. Lo scopo del presente studio è quello di fornire nuove informazioni sulla composizione del colostro suino e d'individuare le associazioni tra la sua composizione in termini di metaboliti, con razza, sopravvivenza e performance della nidiata. In totale 58 campioni di colostro sono stati raccolti da altrettante scrofe di 3 razze italiane: 31 Large White, 15 Landrace e 12 Duroc. Il colostro è stato sgrassato, ultrafiltrato con filtro a 10kDa e analizzato con spettrografia <sup>1</sup>H-NMR. Sono stati identificati 25 composti inclusi monosaccaridi, disaccaridi (lattosio), acidi organici (lattato, citrato e formiato), acidi organici azotati (creatinina) e nucleotidi. La razza e la stagione del parto hanno influenzato la composizione del colostro. Quantità crescenti di taurina e acetato sono state associate rispettivamente con la miglior sopravvivenza e accrescimento della nidiata mentre dimetilammina e cis-aconitato sono associati con la ridotta sopravvivenza dei suinetti. I risultati ottenuti suggeriscono che la composizione del colostro è influenzata da razza e condizioni ambientali, che possono quindi modificarne il contenuto di metaboliti influenzando le performance della nidiata.

### ABSTRACT

Colostrum is the first secretion produced by mammary glands during the hours immediately preceding the parturition and during the following 2-3 days. Colostrum differs from milk and represents an essential vehicle of passive immunity, prebiotic compounds and growth factors for piglets. The aim of the present study is to provide new information about pig colostrum composition and the associations between metabolites, the sows' breed and the survival and growth rates of their litters. Colostrum samples were gathered from 58 parturitions of healthy sows belonging to 3 Italian breeds: 31 Large White, 15 Landrace and 12 Duroc respectively. The defatted and ultrafiltered (10 kDa) colostrum samples were analysed using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. Twenty-five metabolites were identified, comprehending monosaccharides, disaccharides (such as lactose), organic acids (lactate, citrate, acetate and formate), nitrogenous organic acids (such as creatine) and nucleotides. Breed and season of farrowing influenced the colostrum composition. Taurine and acetate were positively related to piglets' survival rate and litter weight gain, respectively,

while dimethylamine and cis-aconitate were linked to new-borns' impaired ability to survive. The results obtained suggest that colostrum composition is affected by breed and environmental conditions which may affect the colostrum metabolites content with possible consequences on piglets' performances.

## INTRODUZIONE

La sopravvivenza dei suini è influenzata principalmente dall'assunzione di colostro e dal peso dei suinetti alla nascita. Questi fattori influiscono inoltre sulle future performance di accrescimento della nidiata stessa (Ferrari et al., 2014). Il colostro rappresenta la principale fonte di energia e di immunità passiva per il suinetto. Recenti studi volti ad analizzare la composizione di latte e colostro bovino e umano hanno dimostrato che oltre alle già note immunoglobuline, vi sono diversi composti con funzioni bioattive, in grado di migliorare la salute dei neonati (Schlimme et al., 2000; Korhonen et al., 2013). Per quanto riguarda il colostro suino tali informazioni non sono ancora disponibili, così come non sono noti gli effetti genetici ed ambientali sulla sua composizione. Lo scopo del presente studio è quello di fornire nuove informazioni sulla composizione del colostro suino e d'individuare le associazioni tra metaboliti del colostro, razza delle scrofe e performance della nidiata.

## MATERIALI E METODI

Le procedure sono conformi alla legislazione italiana relativa agli animali da sperimentazione e sono state approvate dal comitato etico-scientifico per la sperimentazione animale dell'Università di Bologna, Italia.

### Animali e campionamenti

In totale 58 campioni di colostro sono stati raccolti da scrofe di 3 diverse razze: 12 Duroc (D), 15 Landrace (L) e 31 Large White (LW), allevate nello stesso allevamento. Dalla 4° settimana post-inseminazione, le scrofe sono state allevate in box di gruppo ed alimentate con 2.5 kg/giorno di dieta a base di orzo, crusca di grano tenero e soia. A 5 giorni dal parto, le scrofe sono state spostate in box singoli. Al momento del parto, non indotto, il colostro è stato raccolto dopo la nascita del primo suinetto e prima della nascita dell'ultimo, avendo cura di prelevarne da tutti i capezzoli. I campioni sono stati congelati immediatamente e conservati a -80 C°. La data del parto è stata registrata. Il peso di ogni nidiata e la mortalità sono state rilevate alla nascita ed al 3° giorno di vita.

### Preparazione e analisi <sup>1</sup>H-NMR del colostro

Quindici mL di colostro scongelato sono stati diluiti in proporzione 1:1 con acqua pura ed addizionati di 0.02% di sodio azide per inibire la crescita batterica. Il campione è stato sgrassato attraverso ripetute centrifugazioni a 4 C° per 30 minuti a 1500 × g. Cinque mL di fase liquida sono stati filtrati (< 10kDa) mediante apposite provette (Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germania). Il campione filtrato è stato quindi liofilizzato.

Per ogni µg di campione liofilizzato sono stati aggiunti 250 µL di acqua distillata. Ottanta µL del campione ricostituito sono stati miscelati con 720 µL di acqua distillata e 100 µL di una soluzione D<sub>2</sub>O di 3-(trimetilsilil)-propionato-2,2,3,3-d<sub>4</sub> (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Tewksbury, MA, USA) per ottenere una concentrazione finale di 6.25 mmol/L. I campioni sono stati analizzati con <sup>1</sup>H-NMR utilizzando lo spettrometro AVANCE (Bruker BioSpin, Karlsruhe, Germany) ad frequenza di 600.13 MHz. Gli spettri sono stati acquisiti a 32 K punti su una lunghezza spettrale di 7,211.54 Hz (112 ppm). Gli spettri sono stati corretti utilizzando il software TopSpin (versione 3.0; Bruker BioSpin, Karlsruhe, Germany). I segnali sono stati assegnati utilizzando come riferimento il database Chenomx ed informazioni bibliografiche.

### Elaborazione dei dati

In base al rispettivo ordine di parto (OP), le scrofe sono state divise in 2 gruppi: OP1= dal 1° al 3° ordine di parto (27 scrofe); OP2 = dal 4° ordine di parto in poi (31 scrofe). La stagione in cui è

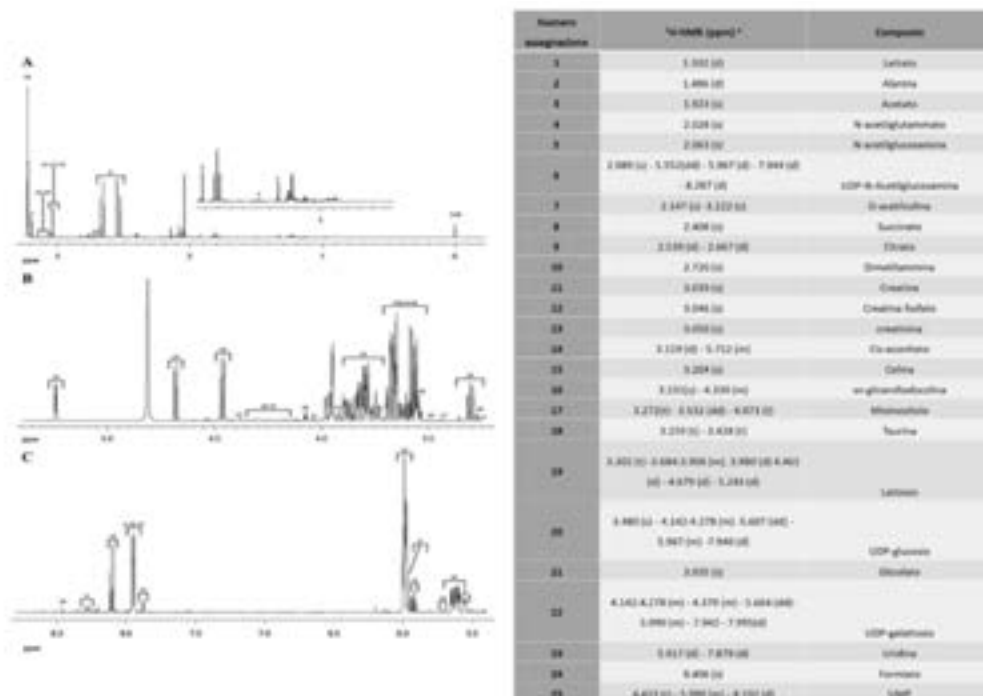
avvenuto il parto è stata classificata da 1 a 4 come segue: 1 = parto tra 1/12 – 28/02 (6 scrofe); 2 = parto tra 01/03 – 31/05 (19 scrofe); 3 = parto tra il 01/06 – 31/08 (21 scrofe); 4 = parto tra il 1/09 e 30/11 (12 scrofe). Gli spettri sono stati analizzati con l'analisi delle componenti principali (PCA). I composti identificati sono stati analizzati tramite ANOVA per valutare l'effetto di razza, stagione, ordine di parto e numerosità della nidiata alla nascita. L'effetto è stato considerato significativo con livello  $P < 0.05$ . I dati di sopravvivenza e performance della nidiata sono stati analizzati inizialmente con tecnica STEP-WISE includendo come fattori i composti identificati nel colostro, la razza della scrofa e la stagione in cui è avvenuto il parto ed in seguito con modello ANOVA.

## RISULTATI

Le scrofe di razza D hanno presentato un numero inferiore di suinetti nati vivi per nidiata ( $8.92 \pm 2.28$ ) rispetto a scrofe di razza L ( $12.60 \pm 1.72$ ) e LW ( $11.90 \pm 2.26$ ) ( $P < 0.0001$ ). I suinetti di razza L e LW avevano un peso inferiore alla nascita ( $1.38 \pm 0.15$  kg e  $1.43 \pm 0.16$  kg, rispettivamente) rispetto ai suinetti di razza D ( $1.59 \pm 0.23$  kg) ( $P = 0.007$ ).

### Caratterizzazione NMR del colostro suino

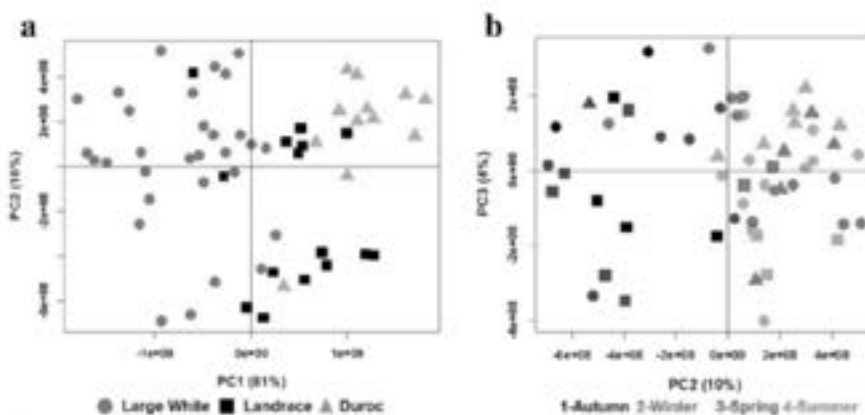
In **Figura 1** sono elencati i 25 composti identificati nel colostro ed i corrispondenti spettri  $^1\text{H-NMR}$ . Nella regione dello spettro compresa tra 3.49 e 4.49 ppm sono stati identificati zuccheri quali lattosio, UDP-glucosio, UDP-galattosio e nucleotidi come UMP. Nella regione dello spettro compresa tra 0,99 e 3,49 ppm sono stati identificati alcuni amminoacidi come treonina, alanina, creatina ed alcuni acidi organici come acido lattico, acido acetico, acido succinico ed acido citrico. Nella regione compresa tra 5,5 e 8,4 ppm sono stati osservati composti fenolici tra cui l'acido formico e ulteriori segnali riconducibili a nucleotidi e zuccheri UDP-glucosio, UDP-galattosio e UMP.



**Figura 1.** Caratterizzazione dello spettro di colostro di scrofa ottenuto con tecnica  $^1\text{H-NMR}$   
**Figure 1.**  $^1\text{H-NMR}$  spectra of sows colostrum and identified metabolites.

### Effetto della razza e della stagione sul profilo metabolico del colostro

Il dataset finale costituito da 58 campioni di colostro e 201 bins è stato analizzato con tecnica PCA. L'OP della scrofa non ha influenzato la composizione del colostro. In Figura 2A è possibile osservare l'effetto della razza: i campioni clusterizzano lungo la 1° e la 2° componente principale (PC). La PC1 spiega l'81% della varianza totale e separa rispettivamente il cluster relativo al colostro di scrofe D rispetto a quello relativo a scrofe LW. La PC2 spiega il 10 % della varianza totale e discrimina il colostro di scrofe L rispetto quello di scrofe LW e D. Analizzando le PC2 e PC3 (varianza spiegata totale = 14%), è possibile osservare che i campioni clusterizzano in accordo con la stagione in cui è avvenuto il parto (Figura 2B). La PC2 discrimina il cluster relativo ai campioni raccolti durante le stagioni 1 e 4 (autunno-inverno) rispetto ai campioni raccolti durante le stagioni 2 e 3 (primavera-estate).



**Figura 2.** Score plot della PCA eseguita su spettri binnati di colostro di scrofa ottenuti con tecnica <sup>1</sup>H-NM. a) PC1 e PC2 b) PC2 e PC3.

**Figure 2.** Score plots of PCA on <sup>1</sup>H-NMR binned spectra of sows' colostrum. a) PC1 vs. PC2 b) PC2 vs. PC3

In Tabella 1 sono riportati i risultati dell'analisi ANOVA per l'effetto di razza e stagione sui composti identificati. La razza ha influenzato la quantità di lattosio, UDP-glucosio, glicolato, UDP-galattosio ( $P < 0.001$ ), citrato, N-acetilglucosamina ( $P < 0.01$ ), alanina, succinato, creatina, creatina fosfato, cis-aconitato, o-acetilcolina, sn-glicerofosfocolina, UDP-N-acetilglucosamina, taurina e mio-inositolo ( $P < 0.05$ ). La stagione in cui è avvenuto il parto ha influenzato la quantità di acetato, dimetilammina, creatina-fosfato, creatinina, cis-aconitato, glicolato e formiato ( $P < 0.001$ ), creatina, taurina, UDP-galattosio, UMP ( $P < 0.01$ ) e alanina ( $P < 0.05$ ).

**Tabella 1** Effetto di razza della scrofa e della stagione del parto sulla composizione di colostro  
**Table 1.** Effect of sows parity order and season of farrowing on the colostrum composition

Metabolita	Razza <sup>1</sup>			SE	P-value	Stagione <sup>2</sup>				SE	P-value
	D	L	LW			1	2	3	4		
Lattato	5.38	6.7	8.88	1.85	NS	4.93	10.18	8.71	4.13	1.81	NS
Alanina	1.77	2.2	2.44	0.17	0.04	1.65	2.5	2.51	1.88	0.17	0.04
Acetato	9.57	11.17	9.9	0.91	NS	13.59	7.55	5.95	13.77	0.89	<.0001
N-Acetilglutamato	6.35	9.9	14.03	3.77	NS	7.94	9.69	8.53	14.21	3.69	NS
N-Acetilglucosamina	10.9	15.4	11.7	1.6	0.003	10.6	14	13.8	12.3	1.6	NS
UDP-N-Acetilglucosamina	22.4	34.4	33.9	2.2	0.01	26.2	33.4	33.8	27.4	2.1	NS
O-Acetilcolina	77.1	196.9	156.6	13.9	0.002	101.7	148.4	171.7	152.3	13.6	NS
Succinato	2.21	3.26	3.5	0.19	0.01	2.59	3.26	3.55	2.55	0.21	NS
Citrato	209	301	257	13	0.002	246	286	265	228	12	0.10
Dimetilammina	2.86	4.44	4.51	0.49	0.09	2.3	5.19	5.39	2.85	0.48	0.0003
Creatina	39.8	59.9	58.7	3.4	0.01	40.9	59	64.7	46.6	3.3	0.002
Creatina fosfato	3.4	7.99	8.01	0.88	0.02	1.9	8.5	10.78	4.69	0.86	<.0001
Creatinina	13.6	16.7	16.5	1.1	NS	19.9	11.8	11.6	19.2	1.1	<.0001
Cis-aconitato	1.41	1.93	1.74	0.14	0.03	1.1	2.14	2.28	1.26	0.14	<.0001
Colina	7.82	10.62	9.91	1.19	NS	8.86	11.64	9.43	7.87	1.16	NS
sn-Glicerofosfocolina	446	543	414	38	0.04	430	457	507	477	37	NS
Mio-inositolo	63.53	76.95	82.86	3.76	0.01	62.58	73.17	81.13	80.91	3.68	0.08
Taurina	1.57	4.1	6.05	0.87	0.02	0.98	6.23	6.19	2.21	0.85	0.005
Lattosio	458	579	811	30	<.0001	535	644	667	619	30	NS
UDP-glucosio	6.07	9.78	6.23	0.54	<.0001	6.08	7.3	8.09	7.97	0.54	NS
Glicolato	28.1	39.8	45.8	2.4	0.0006	28.4	41.8	45.9	35.6	2.3	0.001
UDP-galattosio	32.6	74	42.5	4	<.0001	39.3	54.2	61.4	44	3.9	0.005
Uridina	3.14	3.72	3.23	0.38	NS	3.05	3.55	3.49	3.37	0.38	NS
Formiato	4.49	4.43	4.03	0.35	0.06	6.27	3.04	2.29	5.67	0.34	<.0001
UMP	13.3	24.2	21.6	1.7	1.00	21.82	16.04	16.84	24.08	1.91	0.01

La media rappresenta l'area dello spettro assegnato. Razza<sup>1</sup>: D=Duroc, L=Landrace, LW=Large White. Stagione<sup>2</sup>: 1=01/12-28/02; 2=1/03-31/05; 3=1/06-31/08; 4=1/09-30/11

### Effetto sulle performance e la sopravvivenza dei suinetti

L'analisi STEP-WISE ha evidenziato che oltre alle caratteristiche riproduttive della scrofa anche la quantità di alcuni metaboliti presenti nel colostro è in grado di influenzare i parametri di sopravvivenza e di performance della nidiata, mentre non è stato osservato nessun effetto per l'OP delle scrofe. I risultati significativi ottenuti dell'analisi STEP-WISE sono stati inseriti nel modello ANOVA. I risultati nell'analisi della varianza sono riportati in Tabella 2. **Tabella 2.** Risultati ANOVA per performance e sopravvivenza dei suinetti

**Table 2.** ANOVA results for piglet performance and survival rate

Variabile	Coefficiente	SE	P-value
<b>IPG della nidiata</b>			
Intercetta	0.89	0.69	NS
Razza			NS
LW <sup>1</sup>	0	0	
L <sup>2</sup>	-1.07	0.93	
D <sup>3</sup>	0.35	0.82	
Acetato*Razza			0.01
Acetato*LW <sup>1</sup>	0.09	0.05	
Acetato*L <sup>2</sup>	0.18	0.06	
Acetato*D <sup>3</sup>	0.02	0.08	
Peso suinetti alla nascita	0.01	0.01	<.0001
<b>N. di suinetti svezzati</b>			
Intercetta	9.2	1.82	<.0001
Razza			0.06
LW <sup>1</sup>	0	0	
L <sup>2</sup>	-1.82	1.53	
D <sup>3</sup>	-6.74	2.85	
Cis-aconitato*Razza			<0.01
Cis-aconitato* LW <sup>1</sup>	0.99	1.36	
Cis-aconitato* L <sup>2</sup>	-0.29	0.60	
Cis-aconitato* D <sup>3</sup>	-1.62	0.46	
N. di suinetti nati vivi	0.34	0.11	0.004
<b>N. di suinetti morti a 3 giorni</b>			
Intercetta	-2.23	0.76	0.005
Razza			0.03
LW <sup>1</sup>	0	0	
L <sup>2</sup>	0.19	0.20	
D <sup>3</sup>	-0.27	0.26	
Dimetilammina*Razza			0.001
Dimetilammina* LW <sup>1</sup>	-0.27	0.26	
Dimetilammina* L <sup>2</sup>	0.20	0.20	
Dimetilammina* D <sup>3</sup>	0.47	0.12	
Taurina*Razza			0.04
Taurina* LW <sup>1</sup>	-0.15	0.06	
Taurina* L <sup>2</sup>	-0.15	0.18	
Taurina* D <sup>3</sup>	0.17	0.21	
N. di suinetti nati vivi	0.13	0.06	0.04

## **DISCUSSIONE e CONCLUSIONI**

Questo è il primo studio che ha caratterizzato con tecnica NMR la composizione metabolica, a 10kDa, del colostro suino in diverse razze e che ha evidenziato associazioni tra i metaboliti presenti nel colostro e le performance di crescita e sopravvivenza della nidiata durante il periodo di lattazione.

In accordo con Blasco et al. (1995), il nostro studio ha confermato l'effetto della razza sulle performance riproduttive delle scrofe, infatti le razze LW e L hanno avuto un maggior numero di suinetti nati vivi rispetto la razza D, seppur di peso inferiore. Dal nostro studio si evince inoltre che la razza influenza la composizione del colostro. In particolare, il lattosio è risultato essere il principale metabolita in grado di discriminare il colostro di scrofe D da quello di scrofe LW, dove, in accordo con Zou et al (1992), la quantità di lattosio era superiore.

La composizione di colostro è inoltre risultata essere influenzata dalle condizioni ambientali, quali la stagione. Si è osservata una netta distinzione tra il colostro secreto durante il periodo autunnale-invernale rispetto a quello campionato nel periodo primaverile-estivo. Tale differenza può essere associata ai cambiamenti metabolici delle scrofe in funzione dei fattori ambientali, che hanno particolarmente influenzato il metabolismo energetico. Infatti la maggior quantità di acetato (coinvolto nella lipogenesi della ghiandola mammaria) osservata nel periodo invernale potrebbe essere collegata all'aumento del fabbisogno energetico delle scrofe che si riscontra nei periodi più freddi (Linzell et al., 1969). Così come l'incremento di creatinina e creatina fosfato e la riduzione di creatina nelle stagioni più calde potrebbe essere dovuto ad una maggiore degradazione di creatina in creatinina e creatina fosfato associata alla maggior mobilizzazione delle proteine muscolari che si riscontra nei periodi più caldi (Van Niekerk et al., 1963).

Specifici composti sono stati inoltre associati con i parametri di accrescimento e sopravvivenza delle nidiata. L'effetto favorevole dell'acetato sull'IPG della nidiata dalla nascita al 3°giorno di vita può essere spiegato dal suo utilizzo come substrato energetico per i colonociti, o dal suo impiego come precursore per la sintesi di colesterolo e acidi grassi a lunga catena (Den Besten et al., 2013). La correlazione positiva di taurina nel colostro con la miglior sopravvivenza dei suinetti si può ascrivere al ruolo chiave di questo aminoacido nello sviluppo del sistema nervoso centrale e di tessuti, oltre che nel miglioramento dell'assorbimento lipidico (Aerts et al., 2002; Gaull et al., 1989). L'effetto negativo di dimetilammina nel colostro sulla sopravvivenza dei suinetti è dovuto alla natura genotossica e irritante del composto. Allo stesso modo, anche quantità crescenti di cis-aconitato sono state associate a una maggior mortalità neonatale. Tale risultato probabilmente rispecchia l'alterazione del metabolismo energetico (in particolare il metabolismo dell'acido tricarbossilico) (Cantu et al., 2009) e della risposta immunitaria (O'Neill, 2015), meccanismi in cui il composto è coinvolto.

In conclusione il presente studio ha fornito una descrizione approfondita dei metaboliti presenti nel colostro di scrofa. Lo studio dimostra che il profilo metabolico del colostro è fortemente influenzato dalla razza della e dalle condizioni ambientali. Si è inoltre evidenziato che specifici metaboliti presenti nel colostro possono influenzare le performance di crescita e la sopravvivenza della nidiata.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Aerts L, Van Assche FA. 2002. "Taurine and taurine-deficiency in the perinatal period" *J Perinat Med*.30,281–6.
2. Cantu D, Schaack J, Patel M. 2009. "Oxidative inactivation of mitochondrial aconitase results in iron and H2O2-mediated neurotoxicity in rat primary mesencephalic cultures". *PLoS One*. 4:e7095
3. Den Besten G, Lange K, Havinga R, Van Dijk TH, Gerding A, Van Eunen K, et al. 2013.

- "Gut-derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*305,900–10
4. Ferrari CV, Sbardella PE, Bernardi ML, Coutinho ML, Vaz IS, Wentz I, et al. 2014. "Effect of birth weight and colostrum intake on mortality and performance of piglets after cross-fostering in sows of different parities". *Prev Vet Med.*114, 259–66.
  5. Gaull GE. 1989."Taurine in pediatric nutrition: review and update". *Pediatrics.* 83:433–42.
  6. Korhonen HJ. 2013."Production and properties of health-promoting proteins and peptides from bovine colostrum and milk". *Cell Mol Biol.* 59, 12–24.
  7. Lamarre SG, Edison EE, Wijekoon EP, Brosnan ME, Brosnan JT. 2010. "Suckling rat pups accumulate creatine primarily via de novo synthesis rather than from dam milk". *J Nutr.*140,1570–3.
  8. Linzell JL, Mephram TB. 1969. "Mammary metabolism in lactating sows: arteriovenous differences of milk precursors and the mammary metabolism of [14C] glucose and [14 C]acetate" *Br J Nutr.* 23,319–32.
  9. O'Neill LA. 2015 "A broken krebs cycle in macrophages". *Immunity.* 42,393-4.
  10. Schlimme E, Martin D, Meisel H. 2000. "Nucleosides and Nucleotides: natural bioactive substances in milk and colostrum". *Br J Nutr.* 84, 59–68.
  11. Van Niekerk BD, Reid JT, Bensadoun A, Paladines OL. 1963. "Urinary creatine as an index of body composition". *J Nutr.*79,463–73.
  12. Zou S, McLaren DG, Hurley WL. 1992. "Pig colostrum and milk composition: comparisons between Chinese Meishan and US breeds". *Livest Prod Sci.* 30, 115–27.