

Wytwarzanie etanolu z laktozy przez komórki drożdży unieruchomione w kulkach agaru porowatego

Janusz Szczodrak

Zofia Szczodrak

Adrian Wiater

Zakład Mikrobiologii Przemysłowej
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Lublin

1. Wprowadzenie

W ostatnich latach opublikowano wiele prac na temat zastosowania unieruchomionych komórek drożdży lub bakterii do otrzymywania alkoholu etylowego metodą półciąglą lub ciągłą (1). Zalety stosowania immobilizowanych komórek w fermentacji alkoholowej spowodowały, że zainteresowanie tym procesem nieustannie zwiększa się, tym bardziej, że etanol od czasu światowego kryzysu energetycznego traktowany jest w wielu krajach jako rezerwowe źródło energii i paliw (2). Na szczególną uwagę zasługuje możliwość włączenia tej technologii do wykorzystania olbrzymich zapasów serwatki oraz roślinnych surowców odnawialnych, stanowiących podstawowe produkty uboczne przemysłu rolno-spożywczego (3,4).

Unieruchamianie drożdży w produkcji etanolu oparte jest dotychczas głównie na pułapkowaniu (inkluzji) w żelach, które polega na fizycznym zamknięciu komórek wewnątrz struktury polimeru formowanego najczęściej w postaci kulek. Spośród licznych nośników używanych do pułapkowania drożdży (agar, alginian, karaginan, pektyna, poliakryloamid, żelatyna) na szczególną uwagę zasługują żele agarowe. W literaturze można spotkać doniesienia na temat wykorzystania komórek drobnoustrojów unieruchomionych w kulkach agarowych do produkcji etanolu, ksylitolu i kwasu mlekowego (5,6).

Naturalne żele agarowe odznaczają się nietoksycznością, dużą stabilnością oraz wytrzymałością mechaniczną i mikrobiologiczną, ale są przy tym kruche i łamliwe. Ich zastosowanie do immobilizacji komórek jest często ograniczone ze względu na utrudnioną dyfuzję tlenu i innych składników do wnętrza żelu oraz ograniczony transport na zewnątrz nośnika produktów utworzo-

nych przez unieruchomione w nim komórki (7). W związku z tym opracowano szereg metod polegających na udoskonaleniu niektórych właściwości żeli agarowych. Jako przykład może służyć agar porowaty, otrzymywany poprzez kopolimeryzację agaru i alginianu i odplukaniu z uzyskanej mieszaniny alginianu wapnia za pomocą buforu fosforanowego (8). Utworzony żel odznacza się wysoką porowatością. Cecha ta jest szczególnie ważna w procesach fermentacyjnych, w których zachodzi wzrost komórek i wydzielanie dużej ilości gazów. Unieruchamianie komórek w agarze porowatym pozwala na swobodne wydzielanie produktów gazowych w trakcie fermentacji, co zapobiega z kolei mechanicznemu rozrywaniu nośnika i uwalnianiu komórek.

We wcześniejszych badaniach wyselekcjonowano drożdże *Candida pseudotropicalis* zdolne do wytwarzania dużych ilości etanolu na podłożu z laktozą i zagęszczoną serwatką (9). Celem pracy było określenie optymalnych warunków dla przebiegu fermentacji alkoholowej prowadzonej przez unieruchomione w żelu agaru porowatego komórki *C. pseudotropicalis* oraz ich wykorzystanie w procesie okresowej (półciąglej) fermentacji podłoża zawierających laktozę.

2. Materiały i metody

2.1. Mikroorganizm i podłoża hodowlane

Drożdże *Candida pseudotropicalis* 65 przetrzymywano w temp. 4°C na skosach agaru brzezkowego. Do namnażania biomasy służyła pożywka Hughesa z 2% laktozą (10).

Fermentację alkoholową prowadzono na podłożu Hughesa zawierającym 120 g/l laktozy (podłoże L). Permeat serwatkowy, zawierający 85,25% laktozy, uzyskano z Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie. Podłoże fermentacyjne z dodatkiem permeatu (P) wykonano w dwu wariantach: P+ i P-. Podłoże P- uzyskano przez rozpuszczenie 140 g permeatu serwatkowego w 1 l wody destylowanej (końcowe stężenie laktozy wynosiło 12%). Podłoże P+ przygotowano przez uzupełnienie podłoża P- solami mineralnymi i ekstraktem drożdżowym o składzie identycznym jak w pożywce Hughesa. Serwatkę kwasową o pH 4,3 i stężeniu laktozy 3,92-4,20% otrzymano z Okręgowej Spółdzielni Mleczarskiej w Lublinie. Serwatkę odbiałczano trzykrotnie przez ogrzanie w autoklawie w temp. 117°C przez 5 min i sączenie na sączku z bibuły filtracyjnej. Po zagęszczeniu na wyparce próżniowej uzyskano dwa warianty podłoża serwatkowego (S) różniące się stopniem zagęszczenia. Podłoże określane w dalszej części pracy jako S₂ było zagęszczone 2,8-krotnie (zawartość laktozy 10%), a S₃ 3-krotnie (zawartość laktozy 12%). Odczyn wszystkich pożywek fermentacyjnych ustalano na poziomie 5,0, a następnie rozlewano je w ilości po 100 ml do kolb stożkowych o pojemności 300 ml i wyjaławiano w temp. 117°C w czasie 10 min.

2.2. Immobilizacja

Namnożoną masę drożdży (24-godzinna hodowla) unieruchamiano metodą pułapkowania w żelu agarowym (8,11). Kulki (średnica 2,5-3,0 mm) formowano przez zmieszanie w temp. 47,5°C agaru, drożdży oraz alginianu sodowego i wkropleniu tej mieszaniny do 2% roztworu CaCl_2 . Końcowe stężenie wilgotnej masy drożdży w powstałej mieszaninie wynosiło najczęściej 17%. Po 45 min utrwalania, utworzony alginian wapnia wypłukiwano z kulek za pomocą 0,05 M potasowego buforu fosforanowego (pH 7,5).

2.3. Warunki fermentacji

Fermentację alkoholową przeprowadzano w kolbach stożkowych o 300 ml zaopatrzonych w rurki fermentacyjne i zawierających 100 ml zagęszczonej serwatki (S) lub jej permeatu (P) oraz taką samą ilość podłoża z laktozą (L). Zawartość laktozy w pożywkach wynosiła od 10 do 12%. Po zasianiu pożywek unieruchomionym biokatalizatorem (najczęściej w ilości 200 kulek na kolbę), próby fermentacyjne inkubowano w cieplarni w czasie 48 godz. w temp. 30°C (jeśli nie podano inaczej). Po zakończeniu fermentacji pożywkę odbierano, a kulki suszono do stałej masy lub używano ich do zaszczepiania następnej partii podłoża. Hodowle okresowe powtórzeniowe (ang. *repeated batch culture*) prowadzono w czasie 18 dni, wymieniając podłoże co 36 godz.

Zastosowano następujące parametry charakteryzujące przebieg fermentacji alkoholowej: stopień zużycia substratu ($S = \text{g zużytej laktozy/g wyjściowej laktozy } 100\%$), końcowe stężenie etanolu ($P = \text{g/l}$), wydajność etanolu ($Y_{P/S} = \text{g etanolu/g zużytej laktozy}$), wydajność praktyczna (WP), czyli procentowo wyrażony stosunek wytworzonego alkoholu do maksymalnej ilości etanolu, który mógłby powstać ze zużytej laktozy.

2.4. Metody analityczne

Etanol oznaczano metodą Kellermanna (12), zaś masę nośnika i drożdży wagowo przez wysuszenie w temp. 105°C. Zawartość laktozy w odfermentowanych podłożach mierzono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Analizy tego cukru dokonywano przy użyciu chromatografu cieczowego LC-5A firmy Laboratorni Pristoje (Praga, Czechy), wyposażonego w detektor refraktometryczny RIDK-101. Do badań zastosowano kolumnę stalową o wymiarach 0,4 cm x 15 cm, wypełnioną nośnikiem LiChrosorb-NH₂, 10 µl firmy Merck (Darmstadt, Niemcy). Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu i wody dejonizowanej. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 ml/min, zaś objętość nanoszona na kolumnę próbki 20 µl. Analizę przeprowadzono w warunkach izokratycznych, tj. przy stałym stężeniu acetonitrylu. Próbki płynów pochodzących z podłoży P-, P+, S₂ i S₃ odbiałczano za pomocą 10% TCA, rozcieńczano eluentem do żądanej objętości i odwirowywano.

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Optymalizacja warunków fermentacji laktozy z udziałem immobilizowanych komórek drożdży

Określenie optymalnych warunków dla przebiegu fermentacji laktozy obejmowało takie czynniki jak: stężenie wilgotnej masy drożdży w mieszaninie agaru i alginianu użytej do formowania kulek, ilość dodanych do nastawu drożdży immobilizowanych, temperaturę, wyjściowy odczyn podłoża oraz czas fermentacji.

Zakładając, że ilość dodanych do podłoża kulek agarowych będzie jednokowa, można sądzić, iż czynnikiem decydującym o przebiegu fermentacji będzie stopień nasycenia kulek komórkami drożdży. Jego miarą jest ilość wilgotnej masy drożdży w mieszaninie agaru i alginianu użytej do formowania kulek. W związku z tym zbadano wpływ ilości drożdży w nośniku (w przedziale stężeń od 8 do 25%) na wydajność fermentacji alkoholowej, prowadzonej w czasie 48 godz. na podłożu z laktozą. Należy zaznaczyć, że w tej serii doświadczeń ilość dodanych do nastawu kulek z immobilizowanymi drożdżami była stała i wynosiła 200/100 ml podłoża. Z danych zebranych w tabeli 1 wynika, że optymalne stężenie biomasy w kulkach wynosi 17%. W tych warunkach drożdże wytwarzały około 51 g/l alkoholu etylowego zużywając około 95% zawartej w podłożu laktozy. Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w badaniach opublikowanych wcześniej przez Roukas (13,14) i Rao i wsp. (8), którzy do wzbudzania fermentacji etanolowej stosowali optymalne stężenie immobilizowanych drożdży na poziomie od 11 do 20%.

W tabeli 1 przedstawiono wyniki konwersji laktozy do etanolu po zaszczeniu podłoża różną ilością drożdży immobilizowanych w kulkach agaru porowatego. Nasycenie nośnika biomasą było stałe i wynosiło 17%. Ilość dodanych do podłoża kulek wahała się od 100 do 300, co odpowiadało suchej masie zawartych w nich drożdży od 0,43 do 1,23 g. Wysokie parametry fermentacji (wydajność etanolu rzędu 48 g/l, konsumpcję cukru na poziomie 97%, wydajność praktyczną 77%) otrzymano po dodaniu do pożywki 200 kulek unieruchomionego biokatalizatora i ta ilość nośnika została wybrana do dalszych badań. Zwiększenie liczby kulek do 300 spowodowało jedynie 4,7% wzrost stężenia wytworzonego przez drożdże alkoholu. Również Rymowicz i wsp. (15), w badaniach nad wytwarzaniem kwasu cytrynowego przez unieruchomione w alginianie komórki *Yarrowia lipolytica*, określili optymalną ilość nośnika w podłożu na poziomie 20 g wilgotnej masy, zaś optymalne stężenie zawartych w nich drożdży wynosiło 10%.

TABELA 1

OPTIMALIZACJA WARUNKÓW FERMENTACJI LAKTOZY Z UDZIAŁEM UNIERUCHOMIONYCH W AGARZE POROWATM KOMÓREK *Candida pseudotropicalis*

Czynnik	Drożdże ¹ (g/100 ml)	Parametry fermentacji ²				Końcowe	
		S (%)	P (g/l)	Y _{P/S} (g/g)	pH	WP (%)	
stężenie wilgotnej masy drożdży (%) ³							
8,48	0,22	59,15	41,46	0,58	108,40	4,35	
16,96	0,25	94,24	50,68	0,44	83,22	4,46	
25,44	0,50	95,56	50,68	0,44	82,05	4,33	
liczba kulek na 100 ml podłoża							
100	0,43	89,10	43,77	0,40	75,89	4,25	
200	0,50	97,17	48,38	0,41	76,92	4,20	
300	1,23	97,08	50,68	0,43	80,03	4,38	
temperatura (°C)							
30	0,24	95,56	52,98	0,46	85,79	4,45	
35	0,90	98,33	50,68	0,43	79,63	4,30	
45	0,12	98,41	52,98	0,44	83,17	4,50	
pH							
3,0	0,36	61,81	42,62	0,58	102,49	3,10	
4,0	0,49	77,87	50,68	0,54	100,00	3,82	
5,0	0,48	98,66	52,98	0,44	83,45	4,07	
6,0	0,53	96,42	27,64	0,24	44,33	4,30	
czas fermentacji (godz.)							
12	-	13,89	16,70	0,72	57,62	4,80	
24	-	53,41	31,56	0,50	91,24	4,41	
36	-	85,10	44,34	0,43	84,48	4,43	
48	-	92,26	46,65	0,42	79,19	4,42	
60	-	92,92	46,65	0,41	77,56	4,22	

¹Sucha masa drożdży w nośniku. ²Opisano w rozdziale Materiały i metody. ³Mieszanka agaru, alginianu i drożdży służyła do formowania kulek nośnika z immobilizowanymi drożdżami.

W kolejnych doświadczeniach określano aktywność fermentacyjną immobilizowanych komórek *C. pseudotropicalis* w temperaturach 30, 35 i 45°C. Z zebranych w tabeli 1 danych wynika, że badane drożdże osiągnęły najwyższe wydajności etanolu oraz pozostałych parametrów fermentacji praktycznie w całym zakresie użytych temperatur. Odnotowano jedynie niewielkie obniżenie stężenia alkoholu (o 4,3%) oraz wydajności praktycznej (o 7,2%) w temp. 35°C. Drożdże *C. pseudotropicalis* są znane ze swej dość wysokiej tolerancji na temperaturę (16). Komórki wolne, badane wcześniej w naszym laboratorium (9), wykazywały optimum aktywności fermentacyjnej w temp. 40°C. Jednakże w temp. 45°C wydajność produkowanego przez nie etanolu z laktozy lub zagęszczonej serwatki obniżała się o 48%. W doświadczeniach

z drożdżami immobilizowanymi nie obserwowano w tej temperaturze spadku zawartości alkoholu, co można prawdopodobnie tłumaczyć ochronnym działaniem nośnika na zawarte w nim komórki *C. pseudotropicalis*. W dalszych badaniach zastosowano temp. 30°C jako optymalną dla rozwoju i aktywności fermentacyjnej badanych drożdży. Poza wysokim uzyskiem etanolu w tych warunkach, na jej korzyść przemawiają również mniejsze straty alkoholu powstałe w wyniku jego parowania z podłoża w trakcie fermentacji oraz względy ekonomiczne, w tym niższe koszty związane z ogrzewaniem.

W celu wyboru optymalnego pH, fermentację laktozy przeprowadzano w temp. 30°C przy wartościach pH podłoża w zakresie od 3,0 do 6,0. Maksymalną wydajność przemiany cukru do etanolu (53 g/l) przez immobilizowane w żelu agarowym komórki drożdży, uzyskano po 48 godz. przy wyjściowym pH pożywki równym 5,0, który wybrano do dalszych badań (tab. 1). Z opublikowanych danych uzyskanych w przeprowadzonych badaniach nad fermentacją etanolową prowadzoną na ksylozie i glukozie przy udziale drożdży z gatunków *Candida*, *Pichia* i *Saccharomyces*, za optymalny odczyn podłoża uznano pH w zakresie 4,0-5,0 (5,8,13,14,17,18).

Dynamikę produkcji etanolu i zużycia laktozy na tle innych parametrów fermentacji (pH, $Y_{P/S}$, WP) w czasie 60 godz. hodowli immobilizowanych komórek drożdży przedstawiono w tabeli 1. Spożycie cukru wzrastało w ciągu całego cyklu hodowlanego, przy czym największe tempo jego przyrostu, podobnie jak i nagromadzenie alkoholu, zarejestrowano w okresie pierwszych 36 godz. fermentacji. Mimo że najwyższą wartość produkcji etanolu (46,6%) uzyskano po 48 godz. fermentacji, to jednak była ona tylko o 5% niższa od tej, jaką notowano już po 36 godz. hodowli. Uzyskane rezultaty pozwalają zatem na skrócenie czasu fermentacji o 12 godz., co w istotny sposób podnosi rentowność całego procesu oraz znacznie zmniejsza ryzyko zakażeń mikroflorą postronną.

Podsumowując ten etap badań ustalono, że optymalne warunki dla przebiegu fermentacji laktozy w oparciu na unieruchomionych komórkach *C. pseudotropicalis* są następujące: ilość inoculum na 100 ml podłoża = 200 kulek nośnika o nasyceniu biomasa 17%, temp. 30°C, pH 5,0, czas fermentacji 36 godz.

3.2. Konwersja laktozy do etanolu w serwatce

Ustalone wcześniej optymalne warunki fermentacji posłużyły do prześledzenia zmian jej kinetycznych parametrów w czasie 72-godzinnej hodowli immobilizowanych drożdży *C. pseudotropicalis* na zagęszczonej serwatce kwasowej oraz jej permeacie. Wprowadzono kilka wariantów podłoża serwatkowego, które obejmowały 2,8-krotnie zagęszczoną serwatkę (S_2), serwatkę zagęszczoną 3-krotnie (S_3), permeat wzbogacony dodatkami soli mineralnych (P+) oraz permeat bez dodatku soli (P-). W charakterze podłoża kontrolnego zastosowano pożywkę Hughesa z 12% laktozą (L). Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 2.

TABELA 2

DYNAMIKA FERMENTACJI ALKOHOLOWEJ PROWADZONEJ PRZY UŻYCIU UNIERUCHOMIONYCH KOMÓREK
C. pseudotropicalis W RÓŻNYCH PODŁOŻACH ZAWIERAJĄCYCH LAKTOZĘ¹

Czas fermentacji (godz.)	Podłoże	Parametry fermentacji ²				pH po hodowli
		S (%)	P (g/l)	Y _{P/S} (g/g)	WP (%)	
12	L ³	37,35	18,43	0,41	83,47	4,71
	P+ ⁴	28,41	23,03	0,36	82,12	4,72
	P- ⁵	5,24	9,21	0,35	65,13	4,58
	S ₂ ⁶	8,31	9,21	0,30	57,06	4,45
	S ₃ ⁷	3,66	6,91	0,29	52,66	4,48
24	L	38,52	29,95	0,52	82,33	4,46
	P+	81,36	32,25	0,32	61,30	4,68
	P-	43,92	20,79	0,39	72,99	4,52
	S ₂	29,61	11,51	0,33	59,94	4,44
	S ₃	23,21	9,21	0,32	61,35	4,46
36	L	91,76	48,38	0,43	81,53	4,37
	P+	80,28	39,16	0,40	75,43	4,60
	P-	53,57	32,25	0,50	93,10	4,42
	S ₂	40,34	20,73	0,43	79,45	4,43
	S ₃	25,70	16,12	0,51	96,99	4,45
48	L	96,67	48,38	0,41	77,39	4,34
	P+	80,42	39,64	0,53	101,35	4,56
	P-	81,69	36,86	0,37	69,77	4,34
	S ₂	52,57	27,64	0,44	81,29	4,39
	S ₃	53,66	23,03	0,35	66,36	4,38
72	L	98,00	48,38	0,40	76,34	4,30
	P+	82,13	41,46	0,55	98,20	4,58
	P-	81,19	36,86	0,38	70,20	4,38
	S ₂	87,77	43,77	0,41	77,11	4,43
	S ₃	75,12	39,64	0,43	81,42	4,44

¹Warunki fermentacji: temp. 30°C, wyjściowe pH 5,0, ilość nośnika 200 kulek/100 ml podłoża, stężenie biomasy 16,96%. ²Opisano w rozdziale Materiały i metody. ³⁻⁷L, podłoże z 12% laktozą; P+, permeat serwatkowy wzbogacony dodatkiem soli mineralnych; P-, permeat serwatkowy bez dodatku soli; S₂, serwatka zagęszczona 2,8-krotnie; S₃, serwatka zagęszczona 3-krotnie.

Spośród użytych do fermentacji podłoży, najlepsze wyniki odnośnie do ilości wytworzonego z laktozy alkoholu etylowego osiągnięto na 12% laktozie. Po 36 godzinach hodowli jego wydajność osiągnęła maksymalną wartość równą 48,4 g/l i była skorelowana z wysokim (96%) zużyciem cukru z podłoża. Na pożywce z serwatką osiągnięto dużo niższe wartości poszczególnych wskaźników technologicznych fermentacji, przy czym najlepszym podłożem dla fermentacji laktozy prowadzonej przez drożdże unieruchomione w żelu agarowym okazał się permeat serwatkowy z dodatkiem soli mineralnych. Po 36 godz. drożdże wytwarzały na tym podłożu 39,2 g/l etanolu, tj. o 19,1%

8. Jura J., Kopchick J. J., Chen W. Y., Wagner T. E., Modliński J. A., Reed M. A., Knapp J. R., Smorąg Z., (1994), *Theriogenology*, 41, 1259-1266.
9. Jura J., Kopchick J. J., Chen W. Y., Wagner T. E., Modliński J. A., Reed M. A., Knapp J. R., Kątska L., Attal J., Houdebine L-M., Smorąg Z., (1994), *Proc. Eur. Conf. Embryo Techn. and Genetic Eng. in Cattle and Sheep*, 24-25.03., Kraków, 169-183.
10. Jura J., Smorąg Z., Kątska L., Bak M., (1990), *Theriogenology* (suppl I).
11. Brinster R. L., Chen H. Y., Trumbauer M. E., Yagle M. K., Palmiter R. D., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4438-4442.
12. Fukuda Y., Ichikawa M., Naito K., Toyoda Y., (1990), *Biology of Reproduction*, 42, 114-119.
13. Kątska L., Ryńska B., Smorąg Z., (1995), *Theriogenology*, 43, 859-870.
14. Thomas W. K., Schnieke A., Seidel G. E. Jr, (1993), *Theriogenology*, 40, 679-688.
15. Kay G. W., Hawk H. W., Waterman R. A., Wall R. J., (1991), *Animal Biotechnology*, 2(1), 45-59.
16. Loskutoff N. M., Coren B. R., Barrios D. R., Bessoudo E., Bowen M. J., Stone G., Kraemer D. C., (1986), *Theriogenology*, 25, 168 Abstr.
17. Ellington J. E., Farrel P. B., Simken M. E., Foote R. H., Goldman E. E., McGreyth A. B., (1990), *Journal of Reproduction and Fertility*, 89, 293-299.
18. Eyestone W. H., First N. L., (1988), *Int. Congr. Anim. Reprod. AI., Dublin, Ireland, Vol. 4*, 471.
19. Eyestone W. H., Vignieri I., First N. L., (1987), *Theriogenology*, 27, 228 Abstr.
20. Jura J., Kopchick J. J., Chen W. Y., Modliński J. A., Reed M. A., Smorąg Z., (1992), *IX Kongres PTNW, Olsztyn 15-17.09.1992, I*, 202.
21. Hammer R. E., Pursel V. G., Rexroad C. E., Wall R. J., Bolt D. J., Ebert K. M., Palmiter R. D., Brinster R. L., (1985), *Nature*, 315, 680-683.
22. Jura J., Smorąg Z., Skrzyszowska M., Kątska L., Gajda B., (1996), *Journal of Physiology and Pharmacology, Vol. 47, 2, Suppl. 1*, 156, Abstr.

Influence of DNA concentration on the effectiveness of bovine blastocyst production after WAP-bGH microinjection into germinal vesicle of immature oocytes, zygotes and embryos obtained *in vivo* or *in vitro*

Summary

Microinjection is one of the most successfully used methods to produce transgenic farm animals. But the effectiveness of transgenesis with the use of microinjection, specially in cattle is still low. Many steps of the transgenesis has been found to influence its effectiveness; DNA purity, the site of its injection, the culture system. There are no reports on the influence of a DNA vector concentration influence on the developmental ability of transformed bovine eggs to the blastocyst stage in the *in vitro* culture. In presented experiments we investigated the influence of different DNA concentrations on the developmental rate of microinjected immature bovine oocytes, zygotes and 2-cell embryos to the blastocyst stage.

Key words:

DNA concentration, microinjection, bovine immature oocytes, zygotes, 2-cell embryos, co-culture.

Address for correspondence:

Jacek Jura, National Research Institute of Animal Production, Department of Animal Reproduction, 32-083 Balice/Kraków, Poland, fax: (012) 856733.