

WŁADYSŁAW MIGDAŁ, JAN KACZMARCZYK

Skład chemiczny siary i mleka loch w okresie laktacji

Zespół Hodowli Świń Instytutu Hodowli Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR,
Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Jedynym pokarmem prosiąt do czasu rozpoczęcia dokarmiania jest siara i mleko lochy. Ilość i jakość produkowanego mleka decyduje o liczebności, masie ciała, zdrowotności i przydatności prosiąt do dalszego chowu. W ciągu 56-dniowej laktacji locha produkuje od 200 do 400 kg mleka. O jakości siary i mleka lochy decyduje skład chemiczny — głównie zawartość białka, tłuszczu, laktozy, witamin i składników mineralnych. Najbardziej dynamiczne zmiany w czasie laktacji obserwuje się w zawartości oraz jakości białka i tłuszczu. W pierwszych godzinach po porodzie zawartość białka w siarze dochodzi nawet do 18%, by po 24 godzinach zmniejszyć się do około 9% (20). Od 3—4 dnia laktacji zawartość białka ustala się na poziomie 5—6%. Skład frakcji białkowej, głównie zawartości frakcji albuminowo-globulinowej, która jest nośnikiem ciał odpornościowych decyduje o właściwościach siary. Według Walkiewicza (20) zawartość frakcji albuminowo-globulinowej w siarze po oproszeniu dochodzi do 12,1%, by w 7 dniu laktacji osiągnąć poziom 2,8%, a w 21 dniu poziom 1,4%. Poziom kazeiny waha się od 6,7% po oproszeniu do 3,4% w 4 dniu laktacji. Zawartość tłuszczu w siarze po porodzie wynosi 3—4% i jego zawartość wzrasta do 6—7% w późniejszym okresie laktacji (3, 16, 20). Poziom laktozy w siarze i mleku waha się od 2,5% w pierwszych godzinach po porodzie do 4—5% w kolejnych dniach laktacji (3, 16, 20). Zawartość składników mineralnych w siarze jest niska — około 0,5% i wzrasta do 1,0% pod koniec laktacji. Locha oddaje mleko wyłącznie w czasie ssania przez prosięta (1). Bezpośrednio po porodzie możliwe jest ręczne pozyskiwanie siary bez ingerencji hormonalnej. W późniejszym okresie laktacji można pozyskiwać mleko tylko po iniekcji np. oksytocyny. Podanie oksytocyny i ręczne zdajanie mleka nie wpływa na jego skład chemiczny (7, 13). Nie różni się również składem chemicznym mleko z poszczególnych gruczołów mleknych. Skład chemiczny i ilość produkowanego mleka przez lochę zależy od: rasy (6, 10, 20), okresu laktacji (2, 3, 4, 9, 10), kolejnej laktacji (4, 5), żywienia (3, 9, 11, 13, 14, 15, 22, 23), pory roku (20, 21). W dotychczasowych badaniach składu siary i mleka zwraca się uwagę na zawartość i skład frakcji białkowej decydującej o właściwościach odpornościowych siary. Pomija się skład chemiczny frakcji lipidowej siary i mleka. Stąd też celem badań było przeanalizowanie składu chemicznego frakcji lipidowej siary i mleka loch

od chwili zakończenia porodu do 21 dnia laktacji.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w okresie od września do października 1985 r. na 7 lochach rasy pbz w chlewni RZD Olszanica. Lochy żywno według „Norm” 1981 mieszanka treściwą składającą się z koncentratu białkowego „Prowit” i sruły jęczmiennej — tab. 1. Wiek loch, od których pozyskiwano siarę i mleko był następujący: 2 lochy w drugiej laktacji, 3 lochy w trzeciej laktacji i 2 lochy w czwartej laktacji. Od każdej lochy stosując iniekcję domięśniową 10 I.U. oksytocyny ręcznie zdajano około 100 ml siary lub mleka. Siarę pozyskiwano 1 i 24 godziny po wydaleniu łożyska, a mleko w 7, 14 i 21 dniu laktacji — w 6 godzin po odpasie.

W siarze i mleku metodami klasycznymi oznaczono zawartość: białka, laktozy, popiołu ogółem, wapnia, fosforu, magnezu, potasu, sodu oraz ogólną zawartość lipidów. Przy pomocy chromatografii gazowej oznaczono skład kwasów tłuszczowych frakcji lipidowej zgodnie z zasadami de Mana i Bowlanda (6).

Wyniki i omówienie

Skład chemiczny siary i mleka loch w okresie laktacji przedstawiono w tab. 2, natomiast zawartość kwasów tłuszczowych frakcji lipidowej siary i mleka w tab. 3.

Zawartość białka w siarze 1 godzinę po wydaleniu łożyska wynosiła 11,29%, po 24 godzinach obniżyła się do 10,66%, a w 7 dniu lak-

Tab. 1. Skład chemiczny mieszanki treściwej (%)

Składniki	Mieszanka treściwa
Koncentrat białkowy „Prowit”	20,0
Sruła jęczmienna	80,0
Sucha masa	86,14
Popiół	4,38
Substancja organiczna	81,76
Białko ogólne surowe	16,93
Włókno surowe	4,14
Bez — N — wyciągowe	58,78
Ekstrakt eterowy = 100%	1,91
Kwasy tłuszczowe:	
— Mirystynowy C _{14:0}	0,38
— Palmitynowy C _{16:0}	20,08
— Palmitoleinowy C _{16:1}	0,38
— Stearynowy C _{18:0}	2,84
— Oleinowy C _{18:1}	20,16
— Linolowy C _{18:2}	50,10
— Linolenowy C _{18:3}	4,42
— Eikozenowy C _{20:1}	0,22
— Arachidonowy C _{20:4}	0,10
— Erukowy C _{22:1}	0,02
Białko ogólne strawne (%)	13,60
Energia metaboliczna MJ/kg	12,06

Tab. 2. Skład chemiczny siary i mleka loch w okresie laktacji (%)

Składnik	Okres laktacji				
	1 godz. po wydaleniu łożyska	24 godz. po wydaleniu łożyska	7 dzień po porodzie	14 dzień po porodzie	21 dzień po porodzie
Sucha masa	21,95	21,40	18,15	17,91	17,55
Białko	11,29	10,66	5,65	5,30	5,17
Laktoza	3,97	4,04	4,96	4,89	4,77
Lipidy	5,88	5,98	6,73	6,86	6,69
Popiół	0,7157	0,7185	0,8128	0,8185	0,8771
w tym: Ca	0,0694	0,0744	0,0977	0,0951	0,0923
P	0,1005	0,1054	0,1085	0,1203	0,1275
Mg	0,0141	0,0160	0,0163	0,0156	0,0157
K	0,0804	0,0761	0,0703	0,0650	0,0607
Na	0,0453	0,0486	0,0423	0,0371	0,0346
Wartość energetyczna kJ/kg	5374,66	5239,21	4609,65	4557,56	4442,30

Tab. 3. Skład kwasów tłuszczowych frakcji lipidowej siary i mleka loch w okresie laktacji (%)

Kwasy tłuszczowe (Lipidy ogółem = 100%)	Okres laktacji				
	1 godz. po wydaleniu łożyska	24 godz. po wydaleniu łożyska	7 dzień po porodzie	14 dzień po porodzie	21 dzień po porodzie
Mirystynowy — C _{14:0}	1,84	2,17	2,77	3,22	3,84
Palmitynowy — C _{16:0}	23,41	25,05	27,59	30,69	33,93
Palmitoleinowy — C _{16:1}	5,85	6,27	7,92	10,17	11,24
Stearynowy — C _{18:0}	5,99	5,66	5,78	5,24	4,74
Oleinowy — C _{18:1}	38,94	38,62	39,55	36,08	31,54
Linolowy — C _{18:2}	19,36	17,83	11,35	10,77	10,89
Linolenowy — C _{18:3}	1,06	0,92	0,96	0,87	0,55
Arachidonowy — C _{20:4}	0,87	0,79	0,67	0,59	0,51
Suma egzogennych kwasów tłuszczowych (C _{18:2} +C _{18:3} +C _{20:4})	21,30	19,54	12,89	12,24	11,95

tacji wynosiła 5,65%. Najniższą zawartość białka w mleku obserwowano w 21 dniu laktacji — 5,17%. Najniższy poziom laktozy obserwowano 1 godz. po wydaleniu łożyska — 3,97%, najwyższy w 7 dniu laktacji — 4,96%. Zawartość popiołu wahała się od 0,7157% 1 godz. po wydaleniu łożyska do 0,8771% w 21 dniu laktacji. Z kolejnym dniem laktacji wzrastała zawartość wapnia i fosforu, a obniżała się zawartość sodu i potasu w mleku loch. Poziom tłuszczu w siarce 1 godz. po wydaleniu łożyska wynosił 5,88% i wzrastał do 14 dnia laktacji — 6,86%. W 21 dniu laktacji poziom tłuszczu w mleku osiągnął poziom 6,69%.

W porównaniu z przeżuwaczami siara i mleko loch zawierają w swoim składzie minimalne ilości krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Walkiewicz (21) analizując skład frakcji lipidowej siary i mleka wykazał, że zawartość krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w mleku loch uszlachetnionych nadbużańskich była minimalna i wynosiła w okresie żywienia letniego: kwas masłowy — C_{4:0} — 0,41%, kwas kapronowy — C_{6:0} — 0,40%, kwas kaprylowy — C_{8:0} — 0,34%, kwas kaprynowy — C_{10:0} — 0,22%, kwas laurynowy — C_{12:0} — 0,16%. Ze względu na minimalne ilości tych kwasów w mleku loch nie oznaczano ich zawartości. Pierwszym kwasem, który oznaczano był kwas mirystynowy — C_{14:0}. Jego poziom wahał się od 1,84% 1 godz. po wydaleniu łożyska do 3,84% w 21 dniu laktacji. W mleku loch zwraca uwa-

gę wysoka zawartość kwasu palmitynowego — C_{16:0}. 1 godz. po wydaleniu łożyska jego poziom wynosił 23,41%, a w 21 dniu laktacji — 33,93%. Wysoką zawartością charakteryzował się również kwas oleinowy — C_{18:1} — 38,94% 1 godz. po wydaleniu łożyska i 31,54% w 21 dniu laktacji.

Najbardziej interesującą grupę ze względu na swoje właściwości stanowią egzogenne kwasy tłuszczowe: kwas linolowy — C_{18:2}, kwas linolenowy — C_{18:3} i kwas arachidonowy — C_{20:4}. Zawartość kwasu linolowego obniżyła się z 19,36% 1 godz. po wydaleniu łożyska do 10,77% w 14 dniu laktacji. Obniżeniu uległ również poziom kwasu linolenowego i arachidonowego.

Poziom egzogennych kwasów tłuszczowych (suma C_{18:2}+C_{18:3}+C_{20:4}) w siarce loch 1 godz. po wydaleniu łożyska wynosił 21,30%, a w mleku w 21 dniu laktacji obniżył się do 11,95%. W mleku loch nie wykazano obecności kwasu eikozenowego C_{20:1} i erukowego C_{22:1}. Melichar i wsp. (10) badając skład kwasów tłuszczowych frakcji lipidowej siary i mleka loch rasy wielkopolskiej białej obserwowali w czasie od porodu do 51 dnia laktacji wzrost zawartości kwasu laurynowego, mirystynowego, palmitoleinowego oraz obniżenie zawartości kwasu stearynowego, oleinowego i linolowego. Poziom kwasu linolenowego był różnicowany w kolejnych dniach laktacji. W badaniach de Mana i Bowlanda (4) poziom kwasu linolenowego zmieniał się w kolejnych dniach laktacji. Duncan (5),

Coffey i wsp. (3) analizując skład frakcji lipidowej siary i mleka loch obserwowali podobnie zmiany zawartości kwasów tłuszczowych w kolejnych dniach laktacji.

Zawartość tłuszczu w mleku i skład kwasów tłuszczowych frakcji lipidowej zależy między innymi od żywienia. Istotny wpływ na poziom tłuszczu w mleku lochy ma rodzaj tłuszczów występujących w paszy. Podając w dawce pokarmowej dla loch karmiących oleje roślinne lub tłuszcze zwierzęce można zmieniać skład frakcji lipidowej siary i mleka (18, 23). Kruse i wsp. (9) podając lochom w dawkach pokarmowych kwas linolowy w postaci oleju sojowego obserwowali wzrost zawartości kwasu linolowego i linolenowego w siarze i mleku. Poziom kwasu linolowego w siarze wzrastał do 35,2%, a w mleku do 17,6%. Seerley i wsp. (16) podając lochom karmiącym olej kukurydziany w dawce pokarmowej obserwowali wzrost poziomu kwasu linolowego w siarze do 35,5%. Podobne zmiany zawartości kwasu linolowego w siarze i mleku loch otrzymujących w dawce pokarmowej 10% oleju kukurydzianego obserwowali Miller i wsp. (11). Seerley i wsp. (16), Okai i wsp. (12) podając lochom karmiącym w dawkach pokarmowych tłuszcz zwierzęcy obserwowali wzrost zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych — głównie kwasu palmitynowego oraz kwasu oleinowego. Henning i wsp. (8) wprowadzali do dawek pokarmowych dla loch karmiących srtutę z bobu (*Vicia faba*) i obserwowali w siarze wzrost zawartości kwasu palmitynowego i oleinowego oraz spadek poziomu kwasu linolowego i linolenowego. Zmiany zawartości i składu chemicznego frakcji lipidowej siary i mleka loch żywionych dawkami pokarmowymi z udziałem różnych źródeł tłuszczu pomogą wyjaśnić mechanizm syntezy tłuszczu mleka w gruczole mlecznym lochy. Locha posiada zdolność syntetyzowania kwasów tłuszczowych o łańcuchach nie przekraczających 18 węgli równocześnie z glukozy i octanu (17, 19). Kwasy linolowy, linolenowy i arachidonowy jako kwasy egzogenne nie są syntetyzowane przez organizm lochy i muszą być dostarczone w paszy. Prawdopodobnie po dostaniu się do krwiobiegu przechodzą do siary lub mleka bezpośrednio z krwi. Dotychczas nie wyjaśniono, czym spowodowana jest tak wysoka zawartość egzogennych kwasów tłuszczowych — głównie kwasu linolowego w siarze lochy w pierwszych godzinach po porodzie.

Wysoka zawartość egzogennych kwasów tłuszczowych w siarze i mleku loch, ich właściwości i aktywność biologiczna decydują o odporności i przeżywalności prosiąt, przyrostach, wykorzystaniu paszy — o wynikach odchowu. Poprzez odpowiednie żywienie lochy w ostatnim okresie ciąży i w czasie laktacji, poprzez zwiększenie zawartości tłuszczu w dawkach pokarmowych dla loch karmiących można zmieniać skład chemiczny siary i mleka, a szczególnie skład frakcji lipidowej.

Wnioski

1. Skład chemiczny siary i mleka loch zmienia się w okresie od porodu do 21 dnia laktacji: obniża się poziom białka i suchej masy, wzrasta poziom tłuszczu i popiołu.

2. W okresie od porodu do 21 dnia laktacji zwiększa się zawartość kwasu palmitynowego i palmitoleinowego, a zmniejsza zawartość egzogennych kwasów tłuszczowych: linolowego, linolenowego i arachidonowego.

3. Siara loch 1 godz. po wydaleniu łożyska charakteryzuje się wysoką zawartością białka oraz egzogennych kwasów tłuszczowych — głównie kwasu linolowego.

Piśmiennictwo

1. Barowicz T.: *Medycyna Wet.* 29, 301, 1973.
2. Boyd R. D., Moser B. D., Peo Jr R. R., Lewis A. J., Johnson R. K.: *J. Anim. Sci.* 54, 1, 1982.
3. Coffey M. T., Seerley R. W., Mabry J. W.: *J. Anim. Sci.* 55, 1388, 1982.
4. De Man J. M., Bowland J. P.: *J. Dairy Res.* 30, 339, 1963.
5. Duncan R. H., Garton G. R.: *J. Dairy Res.* 33, 255, 1969.
6. Fahmy M. H.: *Can. J. Anim. Sci.* 52, 621, 1972.
7. Gorewitz R. C., Wachs E. A., Sagi R., Merrill W. G.: *J. Dairy Sci.* 66, 2235, 1983.
8. Henning E., Nielsen H. E., Kruse P. E.: *Livestock Prod. Sci.* 1, 179, 1974.
9. Kruse P. E., Danielsen V., Nielsen H. E., Christensen K.: *Acta Agr. Scand.* 27, 289, 1977.
10. Melichar B., Ingr J., Cerny M., Holub A.: *Zbl. Vet. Med.* A, 22, 27, 1975.
11. Miller G. M., Conrad J. H., Harrington R. B.: *J. Anim. Sci.* 32, 79, 1971.
12. Okai D. B., Aherne F. X., Hardin R. T.: *Can. J. Anim. Sci.* 57, 439, 1977.
13. Pond W. G.: *J. Anim. Sci.* 21, 293, 1962.
14. Seerley R. W., Griffin F. M., McCampbell H. C.: *J. Anim. Sci.* 46, 1009, 1978.
15. Seerley R. W., Pace R. A., Foley C. W., Scarth R. D.: *J. Anim. Sci.* 39, 64, 1974.
16. Seerley R. W., Snyder R. A., McCampbell H. C.: *J. Anim. Sci.* 52, 542, 1981.
17. Smith S.: *J. Dairy Sci.* 63, 357, 1980.
18. Troller G., Lindberg P.: *Acta Vet. Scand.* 6, 118, 1965.
19. Vernon R. G., Flint D. J.: *Proc. Nutr. Soc.* 42, 315, 1983.
20. Walkiewicz A.: *Rocz. Nauk Roln.* 99, 115, 1978.
21. Walkiewicz A.: *Rocz. Nauk Roln.* 99, 119, 1978.
22. White C. E., Head H. H., Bachman K. C., Bazer F. W.: *J. Anim. Sci.* 59, 141, 1984.
23. Witter R. C., Rock J. A. T.: *Br. J. Nutr.* 24, 749, 1970.

Adres autora: mgr inż. Władysław Migdał, 32-744 Łapezyca 81. woj. tarnowski

Магдал В., Качмарчик Я. — Химический состав молозива и молока свиноматок в период лактации

В молозиве и молоке 7 свиноматок польской белой длинноухой породы определили содержание: сухой массы, белка лактозы, золы и жира. При помощи газовой хроматографии определили состав жирных кислот липидной фракции. Молозиво свиноматок через час после удаления последа отличалось высоким содержанием белка — 11,29%, а также экзогенных жирных кислот ($C_{18:2} + C_{18:3} + C_{20:4}$) — 21,30%, главным образом линолевой кислоты $C_{18:2}$ — 19,36%. В очередные дни лактации уровень белка и экзогенных жирных кислот понизился и на 21 день лактации достиг величин — белок — 5,17%, экзогенные кислоты жирные — 11,95%. С родов по 21 день лактации рос уровень жира и золы в молоке свиноматок.

Migdał W., Karczmarczyk J. — Chemical composition of the colostrum and milk of sows during lactation

The content of dry substance, protein, lactose, ash, and fat was determined in the colostrum and milk taken from seven sows of Polish landrace. The composition of fatty acids of lipid fraction was estimated

by means of gas chromatography. One hour after placenta expulsion a high content of protein — 11.29% and exogenic fatty acids ($C_{18:2} + C_{18:3} + C_{20:1}$) — 21.30%, mostly of linoleic acid $C_{18:2}$ — 19.36%, were found. At two consecutive lactations there was found a decrease

of the level of protein and exogenic fatty acids reaching a value of 5.17% and 11.95% respectively (at the 21 day of lactation). The content of fat and ash in sow's milk increased since parturition to the 21-st day of lactation.

ZDZISŁAW SMORAĞ, VIVIANE GARNIER*, JEAN-PAUL RENARD**, BOZENNA WIECZOREK

Wpływ sacharozy na przeżywanie 2-blastomerowych zarodków króliczych zamrażanych szybko w 1,2-propanediolu

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasienniania Zwierząt Instytutu Zootechniki,
32-083 Balice k/Krakowa
* INRA, Jouy-en-Josas
** Instytut Pastera, Paryż

Redukcja zawartości wody w zamrażanej komórce jest jednym z głównych warunków zachowania żywotności po rozmrożeniu. Zmniejszanie zawartości wody w trakcie zamrażania odbywa się w wyniku powstawania zewnątrzkomórkowego lodu, a stopień dehydratacji jest regulowany głównie szybkością zamrażania. Wiadomo jednak, że komórki ssaków zdolne są do utraty znacznej ilości wody również w temperaturach plusowych, ale w środowisku hipertonicznym. Zmniejszanie zawartości wody w komórkach przed mrożeniem, a więc w temperaturach plusowych okazywało się korzystne w przypadku komórek skóry podsuszanych na powietrzu (12), czy erytrocytów poddanych działaniu hyperosmotycznego roztworu sacharozy (6). Podobnie zamrażanie wcześniej dehydratowanych fibroblastów (1) zwiększało przeżywanie po rozmrożeniu. Analogiczne postępowanie było również korzystne przy zamrażaniu zarodków mysich (19). Częściowa dehydratacja zarodków króliczych przed mrożeniem przy użyciu 0,5 M sacharozy pozwoliła ponadto na zastosowanie znacznie szybszego tempa zamrażania, co umożliwiło opracowanie przez Renarda i wsp. (9) prostej i dość efektywnej metody dwustopniowego zamrażania 2-blastomerowych zarodków. Próba zwiększenia dehydratacji zarodków przed mrożeniem zastosowana przez ww. autorów nie przyniosła pozytywnych wyników.

Nie wiadomo natomiast, jaki jest wpływ niewielkich stężeń sacharozy na efektywność zamrażania zarodków. Można jednak zakładać, że dzięki stabilizującemu oddziaływaniu cukrów na błony komórkowe (2, 3, 4) nawet niska koncentracja sacharozy wpłynie korzystnie na wyniki zamrażania.

W przeprowadzonych doświadczeniach badano wpływ niskich koncentracji sacharozy oraz zróżnicowanego stężenia propanediolu na zamrażalność 2-blastomerowych zarodków króliczych przy zastosowaniu szybkiej, dwustopniowej metody zamrażania. Ponadto podjęto próbę określenia osłaniającego działania sacharozy i

propanediolu przy przyjętej procedurze zamrażania.

Materiał i metody

Do badań użyto 2-blastomerowych zarodków króliczych pochodzących od 6-miesięcznych samic rasy nowozelandzkiej. U królic wywoływano superowulację przy użyciu FSH i LH wg metody Kennelly'ego i Foota (5). Po upływie 26—28 godzin od pokrycia zwierzęta ubijano, a zarodki pozyskiwano przez przepłukanie jajowodów przy użyciu PBS uzupełnionego 20% surowicy płodów cielęcych (FCS). Po uzyskaniu i ocenie, zarodki umieszczano na 30 minut w temperaturze pokojowej w roztworze PBS+20% FCS zawierającym 1,0 M — 1,2 propanediolu. Z kolei zarodki umieszczano na 5 minut w jednym z następujących roztworów:

- A. Doświadczenie I — 0,5 do 3,0 M propanediolu + 0,01, 0,1 lub 0,5 M sacharozy w PBS + 20% FCS.
B. Doświadczenie II — 1 M propanediolu + 0,01 M sacharozy, 1,0 M propanediolu, 0,01 M lub 0,8 M sacharozy.

Postępowanie przy zamrażaniu i rozmrażaniu było zbliżone do podanego przez Renarda i wsp. (9). Zarodki zamrażano w słówkach o pojemności 500 μ l, które wcześniej wypełnione zostały następującymi frakcjami: frakcja A — 150 μ l 0,05 M sacharozy w PBS + 20% FCS; frakcja B — 40 μ l powietrza; frakcja C — 150 μ l 0,5 M sacharozy w PBS + 20% FCS; frakcja D — 20 μ l powietrza; frakcja E zawierała 40 μ l jednego z roztworów użytych w doświadczeniu I i II (ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat słowki do szybkiego zamrażania zarodków króliczych

Objaśnienia: A — 0,05 M sacharoza, B — powietrze, C — 0,5 M sacharoza, D — powietrze, E — 0,1 M sacharoza + 1,0 M, — propanediol.

Przygotowane wg powyższego sposobu słowki były przetrzymywane w temp. -25°C przez okres od kilku dni do kilku tygodni. Bezpośrednio przed zamrażaniem zarodków, słówkę wyjmowano z zamrażalnika, obejmując palcami część końcową zawierającą frakcję E. Wówczas następowało podgrzewanie tej frakcji w tempie szybszym niż pozostałych frakcji. Po częściowym rozmrożeniu frakcji E (po 6—8 sekundach trzymania między palcami) umieszczano w niej 5—10 zarodków wraz z niewielką ilością roztworu o temperaturze pokojowej. Następnie słówkę z zarodkami ponownie umieszczano w temp. -25°