

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.01074

## 不同溶剂及对比对轮虫脂肪提取的影响

裴怀全<sup>1</sup>, 董晓庆<sup>1</sup>, 朱成成<sup>1</sup>, 刘洪健<sup>1</sup>, 董婧<sup>2</sup>, 陈玉珂<sup>1</sup>, 张东鸣<sup>1</sup>

1. 吉林农业大学 动物科技学院, 吉林 长春 130118;
2. 沈阳农业大学 畜牧兽医学院, 辽宁 沈阳 110866

**摘要:** 研究了提取溶剂、次数以及溶剂的对比对轮虫脂肪提取的影响。分别用氯仿-甲醇体积比为 2:1、1:1、1:2, 苯石油醚体积比 2:1、1:1、1:2, 丙酮石油醚 1:4、3:7、2:3 作为提取溶剂, 提取冻干轮虫(*Brachionus rotundiformis*)样品脂肪, 测定脂肪含量与皂化值, 筛选得出 3 种提取溶剂的最佳配比; 比较提取次数为 1~3 次间脂肪含量的差异, 得出最佳提取次数; 将 3 种最佳配比与索氏提取法(国标)提取样品脂肪进行比较, 测定脂肪含量与皂化值。结果显示, 在冻干轮虫脂肪提取中, 提取次数对样品脂肪含量没产生显著影响( $P>0.05$ ); 3 种溶剂的最佳配比分别为氯仿-甲醇 2:1、苯石油醚 1:2、丙酮石油醚 2:3; 其中丙酮石油醚 2:3 处理组的脂肪含量和皂化值分别达到 9.71% 和 198, 均显著高于索氏提取法(国标)和其余处理组( $P<0.05$ )。故轮虫脂肪提取 1 次为宜, 最佳溶剂及配比为丙酮石油醚体积比 2:3, 本方法具有提取高、时间短、安全性高、成本低等优点, 具有一定的实际应用价值。

**关键词:** 轮虫; 溶剂; 配比; 脂肪含量; 皂化值

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)06-1074-05

轮虫是一种滤食性的生物, 是江河、湖泊、池塘浮游动物的重要组成部分, 作为鱼、虾类幼体的开口饵料, 其适口性、可得性、营养价值及饲养效果比较好<sup>[1-2]</sup>, 而且适应性强, 生长快, 繁殖迅速, 培养成本低。轮虫的脂肪酸组成和含量是评价轮虫营养价值的最重要指标之一<sup>[3-4]</sup>, 故研究简便快速准确高效的脂肪提取方法可为轮虫样品营养价值评价提供参考。目前, 脂肪含量测定中, 常用的脂肪提取溶剂有氯仿-甲醇<sup>[5-9]</sup>、苯-石油醚<sup>[10-11]</sup>、正己烷<sup>[12-13]</sup>、石油醚<sup>[14]</sup>等, 所以本文比较了几种不同的溶剂处理对提取轮虫脂肪效果的影响, 由于轮虫样品中含有较多水分, 且轮虫脂肪中含较多中性脂肪, 故本实验设计了提取溶剂的不同配比, 通过调整极性溶剂与非极性溶剂的比例改变提取溶液整体的极性, 提高与轮虫脂肪极性接近的程度, 从而能最大程度的萃取出脂肪,

并希望能寻找到可以替代氯仿的提取溶剂, 减少对实验操作人员的危害。本研究以圆型臂尾轮虫(*Brachionus rotundiformis*)为实验对象进行了研究。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器与试剂

离心浓缩仪, 配有真空泵以及 110V 变压器; XHF-D 高速分散器(内切式匀浆机); 高速冷冻离心机、电子分析天平、索氏提取管等。轮虫(*Brachionus rotundiformis*)来自吉林农业大学水产实验室。氯仿、苯、丙酮、石油醚(沸程 30~60)、正己烷、甲醇, 所有试剂均为分析纯。0.5 mol/L 盐酸溶液, 0.5 mol/L 氢氧化钾乙醇溶液等。

#### 1.2 样品处理

轮虫用活性干酵母饲喂 1W 左右, 饲养与 50L 大桶中, 不间断充气, 饲喂期间每天投喂 2 次,

收稿日期: 2011-12-29; 修订日期: 2012-03-19.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671621); 吉林省产业技术与开发项目(2011002-1).

作者简介: 裴怀全(1988-), 男, 在读硕士; 主要从事水生动物营养与饲料科学研究. E-mail: peihuaiquan@126.com

通信作者: 张东鸣, 教授, 博士生导师. E-mail: dmzhang@jlau.edu.cn

每隔两天换水 1 次; 取样的轮虫用冷冻干燥机冻干, 密封储存于干燥器备用。

### 1.3 试验设计

**1.3.1 提取样品脂肪不同的溶剂配比试验** 分别采用如表 1 所示溶剂及不同的配比提取轮虫样品脂肪, 测定脂肪含量与皂化值, 筛选出不同溶剂的最佳提取配比。

表 1 不同提取溶剂的配比(V/V)  
Tab.1 Mixing proportion of different solvents(V/V)

溶剂种类 solvent	配比组 trial		
	I	II	III
氯仿-甲醇 chloroform-carbinal	2:1	1:1	1:2
苯-石油醚 benzene-petroleum ether	2:1	1:1	1:2
丙酮-石油醚 acetone-petroleum ether	1:4	3:7	2:3

**1.3.2 提取样品脂肪不同的溶剂配比提取次数试验** 分别采用以上不同溶剂配比, 提取样品次数分别为 1~3 次, 比较不同的提取次数对样品脂肪提取量的影响, 筛选出最佳提取次数。

**1.3.3 筛选出的 3 种最佳配比溶剂与索氏提取法(国标)提取样品脂肪的比较** 采用筛选出的 3 种最佳配比溶剂提取样品脂肪, 索氏提取法(国标)按国标方法进行, 采用 30~60 沸程石油醚作为提取溶剂, 将样品先进行酸水解, 然后用索氏提取器抽提 4 h, 比较脂肪含量和皂化值的差别。

### 1.4 试验方法

取准备好的样品 0.5 g 左右, 放入 50 mL 离心管中, 每个水平 4 个重复, 分别加入预先制备的混合提取液 15 mL。每种不同的混合提取溶剂分别采用 3 个不同的溶剂配比, 分别用 I、II、III 表示, (表 1), 蒸馏水 5 mL, 用高速分散器混合均匀, 离心后取不同的含脂肪分层液, 真空旋转蒸发 2 h 左右, 采用差量法计算脂肪含量。再对样品重复以上操作 2 次, 3 次, 比较不同的提取次数对脂肪含量的影响; 索氏提取法按国标方法进行, 提取时间为 4 h。

皂化值测定: 在提取得到的脂肪中准确放入 2 mL 氢氧化钾乙醇标准溶液, 置于沸水浴中加热

回流 0.5 h 以上, 使其充分皂化。停止加热, 稍冷, 加酚酞指示剂(1~2 滴), 然后用盐酸标准溶液滴定至红色消失为止。同时吸取 2 mL 氢氧化钾乙醇标准溶液按同法做空白试验。

### 1.5 计算与数据处理

脂肪含量计算公式:

$$\text{脂肪含量} = (m_1 - m_0) / m_{\text{样品}}$$

式中  $m_0$  为真空旋转蒸发前试管重量,  $m_1$  为真空旋转蒸发后试管重量,  $m_{\text{样品}}$  为样品重量。

$$\text{皂化值} = [c(V_0 - V_1) \times M] / m$$

式中  $c$  为盐酸标准溶液的实际浓度;  $V_0$  为空白试验消耗盐酸标准溶液的体积;  $V_1$  为试样消耗盐酸标准溶液的体积;  $m = m_1 - m_0$ ;  $M(\text{KOH})$  为氢氧化钾的摩尔质量(56.1 g/mol)。

采用单因子方差分析(one-way ANOVA)比较不同处理组间脂肪含量、皂化值的差异显著性, 并应用 LSD 和 Duncan 多重检验比较各处理间的均值, 差异显著性水平( $P$ )值设定在 0.05。所有统计分析均采用 SPSS16.0 统计软件。误差和置信度区间以平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SE)表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取次数及溶剂配比对样品脂肪含量的影响

研究结果表明, 氯仿甲醇组中, 提取次数对氯仿甲醇 I、II 组脂肪含量影响差异不显著( $P > 0.05$ ), III 组中提取 3 次比提取 1 次和 2 次脂肪含量高( $P < 0.05$ ); 苯石油醚组, 提取次数对脂肪含量影响差异不显著( $P > 0.05$ ); 丙酮石油醚组, 配比 I 组中提取 3 次比提取 1 次和 2 次脂肪含量高( $P < 0.05$ ), II 组中随提取次数增加脂肪含量提高, 差异显著( $P < 0.05$ ), III 组中提取次数对脂肪含量影响差异不显著( $P > 0.05$ )。提取样品 1~3 次的情况下, 氯仿甲醇 I 组脂肪含量均显著高于苯石油醚 I 组和丙酮石油醚 I 组( $P < 0.05$ ), 丙酮石油醚 I 组均高于苯石油醚 I 组( $P < 0.05$ ); 氯仿甲醇 II 组和丙酮石油醚 II 组均高于苯石油醚 II 组( $P < 0.05$ ), 氯仿甲醇 II 组与丙酮石油醚 II 组差异不显著( $P > 0.05$ ); 氯仿甲醇 III 组低于苯石油醚 III 组和丙酮石油醚 III 组( $P < 0.05$ ), 苯石油醚 III 组低

于丙酮石油醚Ⅲ组( $P<0.05$ )。

采用同种溶剂不同配比分别提取轮虫样品相同次数的情况下, 氯仿甲醇配比 I 组脂肪含量显著高于 II 组和 III 组( $P<0.05$ ), II 组脂肪含量显著高于 III 组( $P<0.05$ ); 苯石油醚组配比 I 组和 II 组脂肪含量显著低于 III 组( $P<0.05$ ), II 组脂肪含量显著低于 I 组( $P<0.05$ ); 丙酮脂肪含量组配比 III 组显著高于 I 组和 II 组( $P<0.05$ ), I 组显著高于 II 组( $P<0.05$ )。3 种提取溶剂中的最佳配比为氯仿甲醇 I 组、苯石油醚 III 组和丙酮石油醚 III 组。

由以上结果可知, 提取冻干轮虫脂肪含量最高的提取液配比分别为氯仿甲醇 I 组, 苯石油醚 III 组, 丙酮石油醚 III 组, 提取最佳次数为 1 次(表 2)。

## 2.2 混合提取液最佳配比与国标法提取轮虫脂肪含量的比较

由图 1 可知, 在提取冻干轮虫脂肪的实验中, 丙酮石油醚 III 组脂肪含量显著高于其余处理组( $P<0.05$ ); 氯仿甲醇 I 组脂肪含量显著高于苯石油醚 III 组和索氏提取法(国标)( $P<0.05$ ); 苯石油醚 III 组与索氏提取法(国标)差异不显著( $P>0.05$ , Duncan); 其中脂肪含量由高到低分别为丙酮石油醚 III 组、氯仿甲醇 I 组、苯石油醚 III 组和索氏

提取法(国标), 故冻干轮虫脂肪提取选择最佳的提取溶液为丙酮石油醚 III 组(体积比 2:3)。

## 2.3 不同提取液的配比与国标法皂化值的比较

由表 3 可知, 氯仿甲醇组混合提取液提取轮虫脂肪中, 氯仿甲醇组配比 I 组、II 组皂化值显著高于 III 组( $P<0.05$ ), I 组与 II 组之间差异不显著( $P>0.05$ ); 苯石油醚组配比 I 组、II 组皂化值显著低于 III 组( $P<0.05$ ), I 组与 II 组之间差异不显著( $P>0.05$ ); 丙酮石油醚组配比 III 组皂化值显著高于 I 组和 II 组( $P<0.05$ ), I 组显著高于 II 组( $P<0.05$ ); 氯仿甲醇 I 组、丙酮石油醚 III 组、索氏提取法(国标)皂化值差异不显著( $P>0.05$ ), 都显著高于苯石油醚 III 组( $P<0.05$ )。由皂化值可得出提取脂肪效果最好的依次为丙酮石油醚 III 组、索氏提取法(国标)、氯仿甲醇 I 组和苯石油醚 III 组。

## 3 讨论

对于轮虫样品一般仅测定脂肪酸含量, 对脂肪提取方法的研究很少。本研究比较了不同的提取溶剂、提取次数以及溶剂的配比对轮虫脂肪提取效果的影响, 结果对轮虫营养的科学评价具有参考价值, 对以后轮虫脂肪方面的研究提供了方法依据。由于轮虫本身缺乏高不饱和脂肪酸, 本

表 2 提取次数及溶剂配比对样品脂肪含量的影响

Tab.2 Effects of extract frequency and different mixing proportion of solvents on lipid content in samples

$n=4; \bar{x} \pm SE; \%$

溶剂 solvent	提取次数 extract frequency	配比组 trial		
		I	II	III
氯仿-甲醇 chloroform-carbinal	1	9.07±0.19 <sup>axA</sup>	6.55±0.14 <sup>ayA</sup>	4.72±0.12 <sup>azA</sup>
	2	9.20±0.17 <sup>axA</sup>	6.69±0.13 <sup>ayA</sup>	4.91±0.12 <sup>azA</sup>
	3	9.35±0.21 <sup>axA</sup>	6.84±0.10 <sup>ayA</sup>	5.04±0.15 <sup>bzA</sup>
苯-石油醚 benzene-petroleum ether	1	4.98±0.08 <sup>axB</sup>	3.54±0.16 <sup>ayB</sup>	6.61±0.23 <sup>azB</sup>
	2	5.10±0.07 <sup>axB</sup>	3.66±0.15 <sup>ayB</sup>	6.70±0.23 <sup>azB</sup>
	3	5.18±0.08 <sup>axB</sup>	3.98±0.15 <sup>ayB</sup>	6.87±0.21 <sup>azB</sup>
丙酮-石油醚 acetone-petroleum ether	1	7.23±0.14 <sup>axC</sup>	6.18±0.40 <sup>axA</sup>	9.17±0.21 <sup>ayC</sup>
	2	7.37±0.12 <sup>axC</sup>	6.35±0.41 <sup>bxA</sup>	9.42±0.18 <sup>ayC</sup>
	3	7.50±0.11 <sup>bxC</sup>	6.55±0.41 <sup>cxA</sup>	9.71±0.06 <sup>ayC</sup>

注: 同组混合溶剂同列间标有 a、b、c 不同字母表示差异显著( $P<0.05$ ); 同行间标有 x、y、z 不同字母表示差异显著( $P<0.05$ ); 不同溶剂相同提取次数同列间标有 A、B、C 不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

Note: Different a, b and c letters of the same array indicate the significant differences( $P<0.05$ ) among the same treatments; different x, y and z letters of the same line indicate the significant differences( $P<0.05$ ) among the same treatments; different A, B and C letters of the solvents in the same array indicate the significant differences( $P<0.05$ ) among the same treatments.

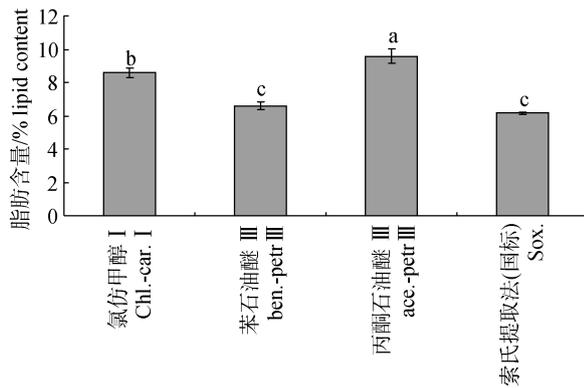


图 1 不同提取处理对轮虫脂肪含量的影响

Fig. 1 Effects of different extract treatment on lipid content of rotifer lipid

各处理组间标有不同字母表示差异显著 (Duncan,  $P < 0.05$ ). Different letters indicate the significant differences ( $P < 0.05$ ) among the treatments.

表 3 溶剂配比对提取样品脂肪皂化值的影响

Tab. 3 Effects of different mixing proportion of solvents on saponification number in samples

溶剂 solvent	配比组 trial		
	I	II	III
氯仿-甲醇 chloroform-carbinal	184±2.08 <sup>ax</sup>	183±1.53 <sup>a</sup>	85±2.08 <sup>b</sup>
苯-石油醚 benzene-petroleum ether	78±3.21 <sup>a</sup>	83.33±2.85 <sup>a</sup>	125±1.62 <sup>by</sup>
丙酮-石油醚 acetone-petroleum ether	183±3.18 <sup>a</sup>	85±1.47 <sup>b</sup>	198±2.4 <sup>cx</sup>
索氏提取法(国标) Soxhlet's extraction		186±1.77 <sup>a</sup>	

$n=4; \bar{x} \pm SE$

注: 同行间标有 a、b、c 不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 列间标有 x、y、z 不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ).

Note: Different letters of a, b and c in the same line indicate the significant differences ( $P < 0.05$ ) among the same treatments. Different letters of x, y and z in the same array indicate the significant differences ( $P < 0.05$ ) among the same treatments.

实验采用活性干酵母饲喂轮虫, 未进行营养强化, 所以营养强化后的轮虫脂肪提取有待于进一步的研究。

本研究发现, 对于本试验中的轮虫样品, 不同提取次数之间脂肪含量差异不大, 第 2 次与第 3 次提出脂肪不多, 占有脂肪的量不超过 10%, 因此本研究建议提取 1 次为最佳, 简化了实验操作步骤, 提高了实验效率。本研究结果与李生梅以石油醚为提取溶剂用索氏提取法提取臭椿皮蛾幼虫脂肪提取次数 1 次为最佳的结果一致<sup>[15]</sup>, 说明提取 1 次即可将样品中绝大部分的脂肪提取出

来。可以有效的替代氯仿甲醇溶剂, 减少了对实验人员的危害。

轮虫脂肪主要由中性脂肪、磷脂以及游离脂肪酸等组成, 其中中性脂肪占总脂的比重最大, 其次为磷脂和游离脂肪酸<sup>[16]</sup>, 导致轮虫脂肪偏极性。本研究比较了不同配比混合的极性溶剂与非极性溶剂对提取样品脂肪含量的影响, 不同极性与非极性萃取溶剂的不同比例搭配使得混合溶剂的极性改变, 所使用的溶剂中丙酮石油醚 III 与可能与轮虫脂肪极性最接近, 其次分别为氯仿甲醇 I、索氏提取法(国标)、苯石油醚 III。根据相似相容原理, 丙酮石油醚 III 提取轮虫脂肪含量最高, 且可避免氯仿甲醇对实验操作人员的危害, 比索氏提取法(国标)更能节省时间, 操作方便。具体对气相色谱上机测定结果的影响本研究将进一步通过上机测定深入研究。

油脂皂化值是指皂化 1 g 油脂中的可皂化物所需氢氧化钾的质量, 可皂化物一般含游离脂肪酸及脂肪酸甘油酯等。皂化值的大小与油脂中所含甘油酯的化学成分有关, 一般油脂的相对分子质量和皂化值的关系是: 甘油酯相对分子质量愈小, 皂化值愈高<sup>[18]</sup>。另外, 若游离脂肪酸含量增大, 皂化值随之增大。通过不同溶剂提取的脂肪测定的皂化值结果看出, 氯仿甲醇 I 组和丙酮石油醚 III 组皂化值较大, 由于这两种混合溶剂与轮虫脂肪的极性最为相近, 所以提取出的脂肪中含有较多游离脂肪酸和可皂化物, 测定得出皂化值较高, 为下一步脂肪酸测定时的酯化皂化奠定了基础, 更有利于脂肪酸含量以及成分的测定分析, 使脂肪酸在气相色谱仪上得出图谱具有较好的分离度以及峰型等。

#### 4 结论

在轮虫脂肪提取过程中, 冻干轮虫样品提取 1 次即可, 丙酮石油醚 2:3 为最佳提取溶剂, 对比氯仿甲醇作为提取溶剂, 减少了药物对实验操作人员的危害, 比国标索氏提取法更能节省时间, 提高试验效率, 且丙酮石油醚比氯仿甲醇溶剂更容易获得, 成本更低。

## 参考文献:

- [1] 陈明耀. 生物饵料培养[M]. 北京: 农业出版社, 1998: 94-110.
- [2] 马云聪, 李全振, 黄金臣, 等. 加快发展轮虫养殖[J]. 河北渔业, 2006(6): 1-2.
- [3] Rodriguez C J, Perez J A, Izquierdo M S, et al. Improvement of the nutritional value of rotifers by varying the type and concentration of oil and the enrichment period[J]. *Aquaculture*, 1996, 147: 93-105.
- [4] 成永旭, 王武, 吴嘉敏, 等. 不同脂肪源对褶皱臂尾轮虫脂类和脂肪酸组成的影响[J]. *中国水产科学*, 2001, 8(4): 52-57.
- [5] 刘晓玲, 周忠良, 江洪波, 等. 褶皱臂尾轮虫(*Branchionus plicatilis*)营养强化技术的研究[J]. *华东师范大学学报: 自然科学版*, 2000(1): 125-129.
- [6] 吴旭干, 成永旭, 贺诗水, 等. 褶皱臂尾轮虫土池低盐度培育及其脂肪酸营养评价[J]. *海洋水产研究*, 2007, 28(4): 59-65.
- [7] 贺诗水. 不同营养强化对褶皱臂尾轮虫脂类和脂肪酸组成的影响[J]. *粮食与饲料工业*, 2010(11): 58-60.
- [8] Folch J, Lees M, Stanley G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues[J]. *J Biol Chem*, 1957, 226:497-509.
- [9] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. *Can J Bio-chem Physiol*, 1959, 37: 911-917.
- [10] 王秋荣, 赵述建, 林利民, 等. 轮虫中 n-3HUFA 含量对大黄鱼仔鱼生长与存活的影响[J]. *集美大学学报: 自然科学版*, 2010, 15(4): 262-266.
- [11] 雷黎立, 常国斌, 王克华, 等. 安卡鸡肌肉脂肪酸组分的气相色谱-质谱联合分析[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(13): 5819-5820.
- [12] 李磊. 利用微藻营养强化时褶皱臂尾轮虫的摄食和脂肪酸组成研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2008:1-57.
- [13] 韩菊, 魏福祥. 采用低毒溶剂提取脂质[J]. *分析化学*, 2002, 30(4): 450-453.
- [14] GB/T 9695.7-88 肉与肉制品 总脂肪含量测定[S], 1989.
- [15] 李生梅. 多种昆虫的油脂提取、脂肪酸成分分析及  $\alpha$ -亚麻酸分离纯化研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006: 1-41.
- [16] 黄丽琼. 冷冻轮虫的脂质营养与使用[J]. *福建水产*, 1987(4): 78-80.
- [17] 王金秀. 蘑菇中脂肪酸提取衍生方法研究与气相色谱法测定[D]. 长春: 吉林大学, 2008: 1-61.
- [18] 陈少东, 陈福北, 杨邦乐, 等. 几种食用油中不饱和脂肪酸和皂化值的测定研究[J]. *化工技术与开发*, 2011, 40(10): 53-55.

## Effects of different extraction solvents on rotifers (*Branchionus rotundiformis*) lipids extraction

PEI Huaiquan<sup>1</sup>, DONG Xiaoqing<sup>1</sup>, ZHU Chengcheng<sup>1</sup>, LIU Hongjian<sup>1</sup>, DONG Jing<sup>2</sup>, CHEN Yuke<sup>1</sup>, ZHANG Dongming<sup>1</sup>

1. Faculty of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

**Abstract:** Effects of lipids extraction on freeze-dried rotifers (*Branchionus rotundiformis*) by extraction solvents of different mixing proportion with different extracting times were studied. Three extraction solvents were designed (chloroform: methanol (V/V) 2:1, 1:1, 1:2, benzene: petroleum ether (V/V) 2:1, 1:1, 1:2, acetone: petroleum ether (V/V) 1:4, 3:7, 2:3) to extract freeze-dried rotifer lipids with 1-3 times extraction. The lipids yield and saponification numbers were determined and were compared with the Soxhlet extractor method (national standard). Results showed that the extracting times did not significantly ( $P>0.05$ ) affect lipid content in all treated groups, and optimum solvent proportion was determined to be chloroform: methanol 2:1, benzene: petroleum ether 1:2 and acetone: petroleum ether 2:3. The lipid content and saponification number of acetone: petroleum ether 2:3 treatment were 9.71% and 198, respectively, and were significantly ( $P<0.05$ ) higher than that of the Soxhlet extractor method and other treatments. The results suggest that one time extraction by acetone: petroleum ether 2:3 would be the optimum treatment for lipids extraction on freeze-dried rotifers.

**Key words:** rotifer; solvent; mixing proportion; lipid content; saponification number