



徐含颖, 曹译文, 吴正球, 等. 拟穴青蟹幼蟹对饲料亮氨酸的需求量 [J]. 水产学报, 2026, 50(5): 059615.

Xu H Y, Cao Y W, Wu Z Q, et al. Dietary leucine requirement of juvenile mud crab (*Scylla paramamosain*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2026, 50(5): 059615 (in Chinese).

拟穴青蟹幼蟹对饲料亮氨酸的需求量

徐含颖, 曹译文, 吴正球, 王骥腾, 陶如冰, 封文萍, 孙玉龙,
董 霁, 陈 强, 韩 涛*
(浙江海洋大学水产学院, 浙江 舟山 316000)

摘要: 【目的】阐明饲料亮氨酸水平对拟穴青蟹幼蟹生长、代谢、抗氧化、基因表达及肝胰腺菌群结构的影响, 并确定其最适需求量。【方法】以初始体重为 (15.07±0.97) mg 的幼蟹为研究对象, 配制亮氨酸水平分别为 2.09% (Leu 1)、2.39% (Leu 2)、2.66% (Leu 3)、2.99% (Leu 4) 和 3.34% (Leu 5) 的 5 种实验饲料, 进行为期 8 周的养殖实验。【结果】饲料亮氨酸水平在 2.09%~2.66% 时, 维持了拟穴青蟹的终末体重 (FBW)、增重率 (WGR) 和特定生长率 (SGR) 处于高水平状态; 超过 2.99% 后拟穴青蟹生长受到显著抑制; 同时, 显著提升了肝胰腺胰蛋白酶、谷丙转氨酶和谷草转氨酶活性, 并显著上调 TOR 信号通路关键基因 (*tor*、*akt*、*s6k1*、*eif4e2*、*4e-bp21*) 表达。相反, 亮氨酸水平在 2.99%~3.34% 时, 则诱发拟穴青蟹机体氧化损伤, 表现为超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活性受抑及丙二醛含量积累, 同时免疫相关基因 (*lzm*、*proPO*) 表达受到抑制。适宜亮氨酸促进了与生长和健康正相关的硫发菌属富集; 而高亮氨酸水平则显著增加了潜在致病菌 (如弧菌属、发光杆菌属) 的比例, 这些菌群与氧化损伤指标呈正相关。【结论】综合生长与生理指标表明, 适宜亮氨酸水平 (2.09%~2.66%) 可促进拟穴青蟹幼蟹生长、增强代谢与抗氧化能力, 并优化肝胰腺菌群结构。基于 WGR 的二阶多项式回归分析, 确定拟穴青蟹幼蟹饲料中亮氨酸的最适需求量为 2.41%。本研究系统揭示了亮氨酸在拟穴青蟹幼蟹生长健康中的作用机制, 研究结果对甲壳动物精准营养饲料的研发具有重要的理论指导意义。

关键词: 拟穴青蟹; 亮氨酸; 生长性能; 抗氧化能力; 肝胰腺微生物

中图分类号: S 963.73⁺¹

文献标志码: A

氨基酸是水生动物生长发育所必需的关键营养素, 不仅参与了蛋白质合成, 还广泛参与机体生长、发育、代谢及免疫过程的调控^[1-2]。支链氨基酸 (包括亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸) 因其侧链具有分支结构而得名, 是水生动物要从外源获取

的必需氨基酸^[3]。其中, 亮氨酸因其独特的代谢调控功能而备受关注, 在水生动物生长、免疫及抗氧化防御中发挥关键作用^[4]。研究表明, 亮氨酸可通过激活雷帕霉素靶蛋白 (TOR) 信号通路调节蛋白质代谢^[5], 并通过增强胰岛素敏感性参与

收稿日期: 2025-10-09 修回日期: 2026-01-05

资助项目: 浙江省万人计划 (2022R52021); 浙江省“十四五”农业新品种选育重大科技专项 (2021C02069-6); 浙江省教育厅一般科研项目 (Y202457266); 浙江省省属高校基本科研业务费专项 (2024J004-3)

第一作者: 徐含颖, 从事水产养殖技术与营养饲料研究, E-mail: xuhanying@zjou.edu.cn

通信作者: 韩涛, 从事水产动物营养与饲料科学技术研究, E-mail: goodhantao@gmail.com



糖脂代谢调控,从而维持机体能量稳态^[6]。除直接通过信号通路参与生长代谢调控外,支链氨基酸还能通过驱动消化道微生物群落结构变化,进一步改善机体糖脂代谢^[7-8]。

目前,有关亮氨酸在水产动物营养中的研究进展已得到多位学者的综述与总结^[1,9]。具体而言,鱼类对饲料亮氨酸的需求量占饲料比例的0.90%~3.40%(相当于饲料蛋白质的3.5%~8.0%)^[10]。在大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)饲料中添加1%亮氨酸可改变其肠道细菌丰富度与多样性,并重塑微生物组成^[11]。此外,在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[12-13]与卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)^[14]中的研究也表明,亮氨酸补充可改善肠道健康,并调节免疫相关信号分子及抗氧化酶活性。甲壳动物饲料亮氨酸需求范围为1.70%~2.48%(相当于饲料蛋白质的4.30%~6.88%)^[4,10]。其中,三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)的亮氨酸需求量为2.21%,缺乏(1.67%)或过量(2.67%)均会显著抑制其生长^[15]。此外,在30%饲料粗蛋白质水平下,2.26%的饲料亮氨酸可促进中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)蛋白质合成、改善生长并提高蛋白质利用率^[16]。类似地,将凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)饲料亮氨酸水平维持在2.60%~2.67%可激活TOR信号通路并刺激蛋白质合成^[17]。

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)是一种广泛分布于太平洋和印度洋沿岸海域的海洋甲壳动物,也是东南亚国家重要的经济养殖蟹类^[18]。它是我国养殖产量最高的海水蟹,2024年养殖产量达162 349 t^[19]。由于关键营养需求数据的缺失,制约了针对拟穴青蟹的专用优质饲料开发,这一问题已成为该物种养殖业可持续发展的主要瓶颈。近年来,已确定拟穴青蟹对多种必需氨基酸的饲料需求量,包括精氨酸(2.34%)^[20]、赖氨酸(2.03%)^[21]、色氨酸(0.394%~0.398%)^[22]和缬氨酸(1.63%~1.76%)^[23]。然而,亮氨酸的需求仍缺乏明确数据支持。为填补这一研究空白,本研究旨在通过评估饲料亮氨酸水平对拟穴青蟹生长性能、体组成、消化代谢酶活性、抗氧化能力,及肝胰腺微生物群落组成的影响,以确定其适宜的饲料亮氨酸需求量。

1 材料与方法

1.1 饲料制备

依据三疣梭子蟹^[15]和中华绒螯蟹^[16]中的相关

研究,本实验配制了5种等氮等能饲料,其亮氨酸水平分别为2.09%(Leu 1)、2.39%(Leu 2)、2.66%(Leu 3)、2.99%(Leu 4)和3.34%(Leu 5)。饲料配方及氨基酸组成分别见表1和表2。在实验饲料制备过程中,所有固体原料经粉碎后过60目筛,晶体氨基酸采用羧甲基纤维素钠进行包被处理以降低溶失^[24]。接着添加鱼油和豆油,置于混合机中充分混匀,向混合均匀的原料中加入适量蒸馏水(约占原料总量的30%),继续搅拌均匀。随后使用双螺杆挤压机(模孔直径0.8 mm)进行制粒,所得颗粒饲料于45℃恒温干燥箱中干燥,最后分装于密封袋中,-20℃冷冻保存备用。

1.2 养殖管理

本研究所用拟穴青蟹幼蟹购自商业育苗场。正式实验前,所有个体在实验室环境下暂养1周,每日于09:00和17:00投喂基础饲料2次。随后进行为期8w的正式饲养实验。选用健康、规格整齐的幼蟹[初始体重(15.07±0.97)mg]共560只,分别饲养于圆柱形独立容器(直径6 cm,高10 cm,容器装水量约250 mL可有效防逃),所有容器均放置于装满消毒海水的养殖桶中。每种实验饲料

表1 饲料配方及主要营养成分(干物质)
Tab. 1 Diet formulation and proximate composition (dry matter) %

项目 item	Leu 1	Leu 2	Leu 3	Leu 4	Leu 5
鱼粉 fish meal	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
酪蛋白 casein	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
氨基酸混合物 amino acid mixture ¹⁾	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
亮氨酸 leucine	0.30	0.60	0.90	1.20	1.50
丙氨酸 alanine	0.82	0.62	0.41	0.21	0.00
糊化淀粉 gelatinized starch	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00
鱼油 fish oil	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
豆油 soybean oil	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
磷脂 phospholipid	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
胆固醇 cholesterol	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
维生素混合物 vitamin mix ²⁾	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
矿物盐混合物 mineral mix ³⁾	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
磷酸二氢钙 monocalcium phosphate	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
胆碱 choline	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
羧甲基纤维素钠 carboxymethylcellulose sodium	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50
纤维素 cellulose	6.38	6.28	6.19	6.09	6.00

· 续表 1 ·

项目 item	Leu 1	Leu 2	Leu 3	Leu 4	Leu 5
主要营养组成(干物质) proximate composition (dry matter)					
水分 moisture	9.23	10.55	11.39	9.56	9.50
粗蛋白 crude protein	50.82	50.15	50.69	49.56	52.15
粗脂肪 crude lipid	10.07	10.52	9.82	10.35	10.78
灰分 ash	7.10	6.99	7.01	7.10	7.24

注: 1)氨基酸混合物(g/100 g), 天冬氨酸 9.04, 谷氨酸 15.64, 丝氨酸 0.81, 组氨酸 1.36, 甘氨酸 7.64, 苏氨酸 5.47, 精氨酸 14.21, 丙氨酸 7.86, 酪氨酸 5.56, 半胱氨酸 1.00, 蛋氨酸 2.19, 苯丙氨酸 4.53, 异亮氨酸 4.44, 缬氨酸 4.17, 赖氨酸 9.89, 脯氨酸 3.59, 色氨酸 1.71。2)维生素混合物(g/kg), VB₁ 5.00, VB₂ 8.00, 烟酰胺 26.00, VH 1.00, 泛酸钙 15.00, VB₆ 3.00, 叶酸 5.00, VC 121.00, VK 2.00, 对氨基苯甲酸 3.00, VB₁₂ 1.00, VA 25.00, VD 25.00, VE 50.00, 肌醇 181.00, 纤维素 529.00。3)矿物盐混合物(g/kg), 磷酸二氢钙 122.87, 乳酸钙 474.22, 磷酸二氢钠 42.03, 硫酸钾 163.83, 硫酸亚铁 10.78, 柠檬酸铁 38.26, 硫酸镁 44.19, 硫酸锌 4.74, 硫酸锰 0.33, 硫酸铜 0.22, 氯化钴 0.43, 碘酸钾 0.02, 氯化钠 32.33, 氯化钾 65.75。

Notes: 1) amino acid mix (g/100 g), aspartic acid 9.04, glutamic acid 15.64, serine 0.81, histidine 1.36, glycine 7.64, threonine 5.47, arginine 14.21, alanine 7.86, tyrosine 5.56, cysteine 1.00, methionine 2.19, phenylalanine 4.53, isoleucine 4.44, valine, 4.17, lysine 9.89, proline 3.59, tryptophan 1.71。2) vitamin mix (g/kg), VB₁ 5.00, VB₂ 8.00, niacinamide 26.00, VH 1.00, calcium pantothenate 15.00, VB₆ 3.00, folic acid 5.00, VC 121.00, VK 2.00, p-aminobenzoic acid 3.00, VB₁₂ 1.00, VA 25.00, VD 25.00, VE 50.00, inositol 181.00, cellulose 529.00。3) mineral mix (g/kg), calcium dihydrogen phosphate 122.87, lactate 474.22, sodium dihydrogen phosphate 42.03, potassium persulfate 163.83, ferrous sulfate 10.78, iron citrate 38.26, magnesium sulfate 44.19, zinc sulfate 4.74, manganese sulfate 0.33, copper sulfate 0.22, cobalt chloride 0.43, iodate 0.02, sodium chloride 32.33, potassium chloride 65.75。

设 4 个重复, 每重复 28 只蟹。养殖期间每日定时 (09:00 和 17:00) 手动投喂对应饲料至饱食。投喂 1 h 后, 更换 30% 水体, 并及时清除残饵、粪便、蜕壳及死亡个体, 同时记录每日蜕壳与死亡情况。整个养殖期间环境参数控制如下: 水温 27~31℃、盐度 29、溶解氧 >6 mg/L、氨氮 <0.05 mg/L、水面光照强度约 300 lx(全光谱), 光周期设置为 12L : 12D。本研究所涉及的动物实验操作均严格遵守中华人民共和国科学技术部《关于善待实验动物的指导性意见》等法规的规定, 并受浙江海洋大学实验动物福利与伦理委员会监督。

1.3 样品收集

饲养实验结束并经 24 h 禁食处理后, 将幼蟹置于冰上麻醉, 逐只称量并记录终末体重 (FBW)。

随后, 从每个重复中随机取 10 只蟹用于全蟹体成分分析; 其余个体立即解剖以分离肝胰腺。所有组织样本经液氮速冻后, 于 -80℃ 超低温冰箱中保存, 供后续分析使用。

1.4 生长性能检测指标与方法

存活率 (SR, %) = $N_t/N_0 \times 100\%$;

增重率 (WGR, %) = $(W_t - W_0)/W_0 \times 100\%$;

特定生长率 (SGR, %/d) = $(\ln W_t - \ln W_0)/t \times 100\%$;

蜕壳频率 (MF) = $2 \times M/(N_t + N_0)$

式中, N_t 为实验结束时蟹的个数, N_0 为实验开始时蟹的个数, W_t 为实验结束时蟹的体重, W_0 为实验开始时蟹的体重, t 为实验天数, M 为实验结束时蟹蜕壳数。

1.5 成分分析

实验饲料与全蟹体成分均依据 AOAC 标准方法^[25]进行检测。水分含量通过 105℃ 恒温烘箱干燥至恒重测定; 粗脂肪和粗蛋白分别采用索氏抽提系统 (ST 8000, FOSS, 丹麦) 与杜马斯定氮仪 (Dumatec 8000, FOSS, 丹麦) 进行分析; 灰分含量通过马弗炉 550℃ 灼烧 12 h 获得。饲料与全蟹的氨基酸组成使用高效液相色谱仪 (1260 Infinity II, Agilent, 美国) 测定。

1.6 酶活性分析

取拟穴青蟹肝胰腺组织, 按质量体积比 1 : 9 加入预冷生理盐水 (0.9% NaCl) 进行匀浆, 4℃ 条件下 2 500 r/min 离心 10 min, 收集上清液用于后续酶活性测定。采用南京建成生物工程研究所商品化试剂盒, 分别测定胰蛋白酶 (TRY, A080-2-2)、脂肪酶 (LPS, A054-2-1)、淀粉酶 (AMS, C016-1-2)、谷丙转氨酶 (ALT, C009-2-1)、谷草转氨酶 (AST, C010-2-1)、超氧化物歧化酶 (SOD, A001-3-2)、过氧化氢酶 (CAT, A007-1-1) 活性, 以及丙二醛 (MDA, A003-1-2) 含量和总抗氧化能力 (TAOC, A015-2-1)。

1.7 基因表达分析

采用商业试剂盒 (RC202-01, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 从青蟹肝胰腺中提取总 RNA, 并使用琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度法检测 RNA 的完整性和纯度。使用商业试剂盒 (RK20429, 爱博泰克生物科技股份有限公司) 进一步将 RNA 反转录为 cDNA。使用实时荧光定量 PCR

表 2 饲料氨基酸组成 (干物质)
Tab. 2 Amino acid composition of diets (dry matter)

氨基酸 amino acid		Leu 1	Leu 2	Leu 3	Leu 4	Leu 5
必需氨基酸(EAA) essential amino acid	亮氨酸 leucine	2.09	2.39	2.66	2.99	3.34
	蛋氨酸 methionine	1.06	1.03	1.03	1.06	1.03
	缬氨酸 valine	1.95	1.95	1.98	2.05	2.09
	苏氨酸 threonine	2.16	2.10	2.15	2.28	2.32
	苯丙氨酸 phenylalanine	2.13	2.10	2.32	2.11	2.23
	赖氨酸 lysine	3.55	3.35	3.46	3.58	3.65
	组氨酸 histidine	0.79	0.77	0.77	0.79	0.82
	精氨酸 arginine	4.22	3.95	3.95	4.27	4.29
	异亮氨酸 isoleucine	1.96	1.91	1.95	1.98	2.06
非必需氨基酸(NEAA) nonessential amino acid	天冬氨酸 aspartic acid	4.15	4.08	4.04	4.27	4.30
	酪氨酸 tyrosine	1.88	1.80	1.79	1.85	1.88
	丝氨酸 serine	1.31	1.38	1.39	1.37	1.42
	谷氨酸 glutamic acid	7.27	7.40	7.50	7.60	7.75
	脯氨酸 proline	2.18	2.55	2.65	2.65	2.73
	甘氨酸 glycine	2.67	2.99	2.82	2.76	2.81
	丙氨酸 alanine	3.74	4.02	3.73	3.31	3.26

仪 (QuantStudio™ 6 Flex, Life Technologies, 美国) 分析雷帕霉素靶蛋白 (*tor*)、核糖体蛋白 S6 激酶 (*s6k1*)、真核细胞翻译起始因子 4E2(*ef4e2*)、真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 2-1(*4ebp21*)、真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 2-2(*4ebp22*)、蛋白激酶 B(*akt*)、酚氧化酶原 (*proPO*)、溶菌酶 (*lzm*) 基因的转录水平。18S 核糖体 RNA(18S) 基因作为管家基因。本研究中使用特异性引物如表 3 所示。通过比较 CT 法 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法)^[26] 计算目的基因相对表达量。

1.8 细菌群落结构分析

采用 16S rRNA 基因高通量测序的方式进行青蟹肝胰腺细菌群落结构分析。首先使用商业试剂盒 (D0063, 上海碧云天生物技术有限公司) 抽取肝胰腺组织基因组 DNA, 以 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 为引物扩增 16S rRNA 基因的 V3~V4 区域。扩增产物委托广东美格基因科技有限公司进行文库构建及测序, 获得的原始序列经质控、拼接、去噪及物种注释后, 用于后续细菌群落结构分析。

1.9 数据分析

所有数据均采用 R 软件 (4.2.1 版) 进行统计分

析。生长、体组成、酶活性及基因表达数据在分析前均经方差齐性 (Levene 氏检验) 与正态性

表 3 特异性引物序列

Tab. 3 Specific primer sequences

基因 gene	序列(5'-3') sequence (5'-3')	产物长度/bp amplicon length
<i>tor</i> -F	GCGGGCCTACAACCTCTATGG	175
<i>tor</i> -R	CAGCGAGCGGACTTGTAAAGA	
<i>s6k1</i> -F	GGTGCGAAGATATCAGGGGA	161
<i>s6k1</i> -R	AGTGAAGGGTGACGAGGAAG	
<i>ef4e2</i> -F	AACATCCCCGACACGTAAC	78
<i>ef4e2</i> -R	GTTTTTGGCAGTGGAGCCAG	
<i>4ebp21</i> -F	TCACACCGACCTTACAATC	89
<i>4ebp21</i> -R	GCAGACATCACAGCAAGA	
<i>4ebp22</i> -F	CTTCACACCGACCTTACAA	91
<i>4ebp22</i> -R	GCAGACATCACAGCAAGA	
<i>akt</i> -F	GTGTTGACTGGTGGGGCTAT	184
<i>akt</i> -R	TTGTTGGGTCCTTGTGC	
<i>proPO</i> -F	AGGTAGCACAGCCAGATGGT	213
<i>proPO</i> -R	CATTGGTGAAGGTGATGGTG	
<i>lzm</i> -F	TGCCATCAACCACCACAAC	196
<i>lzm</i> -R	CCCCTTCCCTTCCACTTCT	
18S-F	TTTCTCGATTCCGGTGGTGG	94
18S-R	GTAGGCCAGAGTCTCGTTCG	

(Kolmogorov-Smirnov 检验) 检验。符合方差齐性条件的数据采用单因素方差分析 (ANOVA), 否则使用 Kruskal-Wallis 非参数检验; 当检验结果显著 ($P < 0.05$) 时, 进一步采用 Duncan 氏多重比较法进行事后分析。

肝胰腺细菌群落分析在美格基因云平台 (<https://cloud.magigene.com/yomics>) 及 R 软件中完成。 α 多样性 (包括 Asv 丰富度和 Shannon 指数) 组间差异通过 Kruskal-Wallis 检验评估; 采用非度量多维尺度分析 (NMDS) 结合相似性分析 (ANOSIM) 揭示群落组间结构的差异; 基于 KEGG 数据库, 利用 PICRUST2 对菌群功能进行

预测; 最后通过 Spearman 相关分析探究所选生理指标与肝胰腺微生物组成之间的相关性。

2 结果

2.1 生长性能

各处理组拟穴青蟹存活率为 96.43%~98.21% (表 4), 组间差异不显著 ($P > 0.05$)。当饲料亮氨酸水平达到 Leu 4 组时, 拟穴青蟹 FBW、WGR 和 SGR 均显著降低 ($P < 0.05$)。基于增重率的二次多项式回归分析表明, 拟穴青蟹幼蟹饲料中的亮氨酸适宜需求量为 2.41% (图 1)。

表 4 饲料亮氨酸水平对拟穴青蟹生长性能的影响

Tab. 4 Effect of dietary leucine levels on the growth performance of *S. paramamosain*

项目 item	Leu 1	Leu 2	Leu 3	Leu 4	Leu 5
存活率/% SR*	98.21 ± 2.06	98.21 ± 2.06	96.43 ± 4.12	97.32 ± 5.36	97.32 ± 1.79
青蟹末重/g FBW	0.57 ± 0.01 ^a	0.55 ± 0.02 ^{bc}	0.56 ± 0.03 ^c	0.51 ± 0.02 ^{ab}	0.50 ± 0.04 ^a
增重率/% WGR	3 680.11 ± 81.00 ^c	3 496.70 ± 118.55 ^{bc}	3 623.59 ± 206.22 ^c	3 256.11 ± 130.01 ^{ab}	3 162.10 ± 290.09 ^a
特定生长率/(%/d) SGR	6.49 ± 0.04 ^c	6.40 ± 0.06 ^{bc}	6.46 ± 0.10 ^c	6.28 ± 0.07 ^{ab}	6.22 ± 0.16 ^a
蜕壳频率 MF	4.60 ± 0.24	4.60 ± 0.34	4.75 ± 0.18	4.69 ± 0.20	4.80 ± 0.27

注: “*”表示采用Kruskal-Wallis非参数检验。同一行数据标有不同字母表示统计学差异显著($P < 0.05$), 下同。

Notes: “*” means that the Kruskal-Wallis test was applied. Data with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$), the same below.

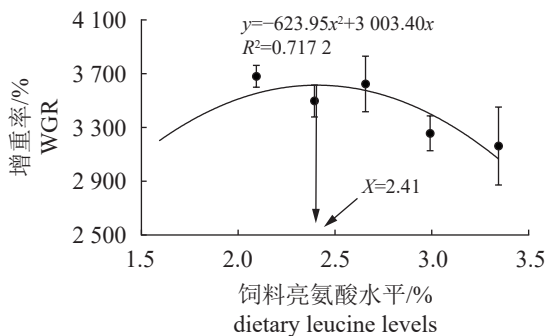


图 1 拟穴青蟹增重率与饲料亮氨酸水平之间的关系

Fig. 1 Quadratic curve model for the relationship between WGR and dietary leucine levels in *S. paramamosain*

2.2 体组成

尽管各处理组之间未观察到显著差异, 但全蟹粗蛋白含量呈现出先升高后降低的趋势。当饲料亮氨酸水平达到 Leu 5 组时, 拟穴青蟹全蟹氨基酸含量 (包括必需氨基酸和非必需氨基酸) 均显著降低 ($P < 0.05$)。具体而言, 随着饲料亮氨酸水平的升高, 全蟹精氨酸和赖氨酸含量显著下降 ($P < 0.05$) (表 5, 表 6)。

2.3 消化酶和转氨酶活性

随着饲料亮氨酸水平升高, 消化酶活性呈现先升高后降低趋势, 其中 Leu 3 组达到最高值, Leu 5 组最低。具体而言, Leu 5 组 TRY 活性显著低于 Leu 1~3 各组 ($P < 0.05$)。转氨酶活性随饲料亮氨酸水平增加同样表现出先升后降的变化规律。ALT 活性在 Leu 2 组达到峰值, AST 活性则在 Leu 3 组升至最高, 且均显著高于 Leu 4 和 Leu 5 组 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.4 抗氧化能力

当饲料亮氨酸水平达到 Leu 4 组时, MDA 含量急剧上升, SOD 和 CAT 活性均显著降低 ($P < 0.05$), TAOC 呈先上升后下降趋势 ($P > 0.05$) (图 3)。

2.5 基因表达

TOR 信号通路相关基因 (*akt*、*tor*、*s6k1*、*4ebp21*、*4ebp22*、*EIF4E2*) 转录水平随饲料亮氨酸水平升高而增强, 在 Leu 3 组达到峰值后显著下降 ($P < 0.05$)。免疫相关基因 (*proPO* 和 *lzm*) 的表达

表 5 饲料亮氨酸水平对拟穴青蟹全蟹体组成的影响

项目 item	Leu 1	Leu 2	Leu 3	Leu 4	Leu 5
水分 moisture	77.06 ± 2.12	76.48 ± 0.69	76.93 ± 2.17	76.41 ± 2.99	77.95 ± 2.64
粗蛋白 crude protein	8.34 ± 0.94	8.43 ± 0.53	8.47 ± 1.16	8.32 ± 1.22	7.58 ± 1.17
粗脂肪 crude lipid	2.73 ± 0.30	2.69 ± 0.41	2.32 ± 0.38	2.48 ± 0.47	2.77 ± 0.54

表 6 饲料亮氨酸水平对拟穴青蟹全蟹氨基酸含量的影响(干物质)

氨基酸 amino acid	Leu 1	Leu 2	Leu 3	Leu 4	Leu 5
蛋氨酸* methionine	0.60 ± 0.02	0.59 ± 0.03	0.61 ± 0.04	0.58 ± 0.02	0.54 ± 0.05
缬氨酸* valine	1.13 ± 0.03	1.13 ± 0.02	1.17 ± 0.06	1.13 ± 0.03	1.06 ± 0.07
亮氨酸* leucine	1.70 ± 0.05	1.72 ± 0.04	1.75 ± 0.10	1.68 ± 0.05	1.59 ± 0.13
苏氨酸* threonine	1.19 ± 0.03	1.19 ± 0.03	1.21 ± 0.06	1.15 ± 0.03	1.10 ± 0.09
苯丙氨酸* phenylalanine	1.08 ± 0.03	1.07 ± 0.02	1.08 ± 0.06	1.03 ± 0.03	0.98 ± 0.07
赖氨酸* lysine	1.68 ± 0.05 ^c	1.62 ± 0.05 ^{bc}	1.62 ± 0.11 ^{bc}	1.53 ± 0.05 ^{ab}	1.45 ± 0.12 ^a
组氨酸* histidine	0.63 ± 0.02	0.63 ± 0.01	0.64 ± 0.04	0.61 ± 0.02	0.58 ± 0.04
精氨酸* arginine	3.69 ± 0.22 ^c	3.56 ± 0.11 ^c	3.44 ± 0.09 ^{bc}	3.24 ± 0.13 ^b	2.91 ± 0.25 ^a
异亮氨酸* isoleucine	1.00 ± 0.03	1.01 ± 0.02	1.04 ± 0.06	1.00 ± 0.03	0.93 ± 0.08
总必需氨基酸* Σ EAAAs	12.71 ± 0.46 ^b	12.52 ± 0.29 ^b	12.53 ± 0.52 ^b	11.94 ± 0.28 ^b	11.14 ± 0.85 ^a
天冬氨酸* aspartic acid	2.43 ± 0.10	2.46 ± 0.05	2.50 ± 0.15	2.38 ± 0.08	2.29 ± 0.18
酪氨酸* tyrosine	0.97 ± 0.03	0.99 ± 0.04	0.98 ± 0.06	0.95 ± 0.04	0.87 ± 0.09
丝氨酸* serine	1.15 ± 0.03	1.14 ± 0.03	1.16 ± 0.07	1.09 ± 0.03	1.06 ± 0.09
谷氨酸* glutamic acid	3.87 ± 0.14	3.95 ± 0.09	3.95 ± 0.25	3.77 ± 0.12	3.59 ± 0.33
脯氨酸* proline	1.51 ± 0.09 ^a	1.60 ± 0.04 ^{ab}	1.77 ± 0.12 ^c	1.70 ± 0.08 ^{bc}	1.70 ± 0.15 ^{bc}
甘氨酸* glycine	2.25 ± 0.10	2.27 ± 0.08	2.28 ± 0.14	2.15 ± 0.11	2.02 ± 0.18
丙氨酸* alanine	1.63 ± 0.08	1.65 ± 0.04	1.71 ± 0.11	1.73 ± 0.11	1.61 ± 0.19
总非必需氨基酸* Σ NEAAs	13.80 ± 0.47 ^b	14.05 ± 0.28 ^b	14.34 ± 0.89 ^b	13.76 ± 0.47 ^b	13.13 ± 1.12 ^a

注：“*”表示采用Kruskal-Wallis非参数检验。

Notes: "*" mean that the Kruskal-Wallis test was applied.

量也在 Leu 3 组达到最高值 ($P < 0.05$) (图 4)。

2.6 肝胰腺细菌群落结构

硫发菌属 (*Thiothrix*) 的丰度随饲料亮氨酸水平增加呈现先上升后下降的趋势, 在 Leu 4 组显著降低 (图 5)。弧菌属 (*Vibrio*) 和发光杆菌属 (*Photobacterium*) 的丰度在 Leu 4~5 组均有所上升。其中, Leu 1~3 组以硫发菌属为优势菌属, Leu 4 组转为弧菌属显著优势, Leu 5 组则以发光杆菌属为优势菌群。

饲料亮氨酸水平对拟穴青蟹肝胰腺微生物群落的 ASV 丰度和 Shannon 指数无显著影响 (图 6)。基于非度量多维尺度 (NMDS) 和相似性分析

(ANOSIM) 发现, 各组肝胰腺微生物群落组成存在显著性差异: Leu 1 组与 Leu 2、Leu 3、Leu 5 组, Leu 2 组与 Leu 5 组, 以及 Leu 3 组与 Leu 4、Leu 5 组均呈现显著性差异 (图 7)。

适宜亮氨酸组 (Leu 3) 肝胰腺微生物功能主要富集在内分泌系统、消化系统、复制与修复、核苷酸代谢、能量代谢、转录、辅酶与维生素代谢及翻译等功能途径; 而高亮氨酸组 (Leu 5) 则主要富集在细菌感染性疾病、免疫系统及寄生虫感染性疾病等相关功能 (图 8)。

2.7 相关性分析

硫发菌属和红杆菌科未分属 (*unclassified_f_Rhodobacteraceae*) 与 FBW、WGR、SGR、AMS、

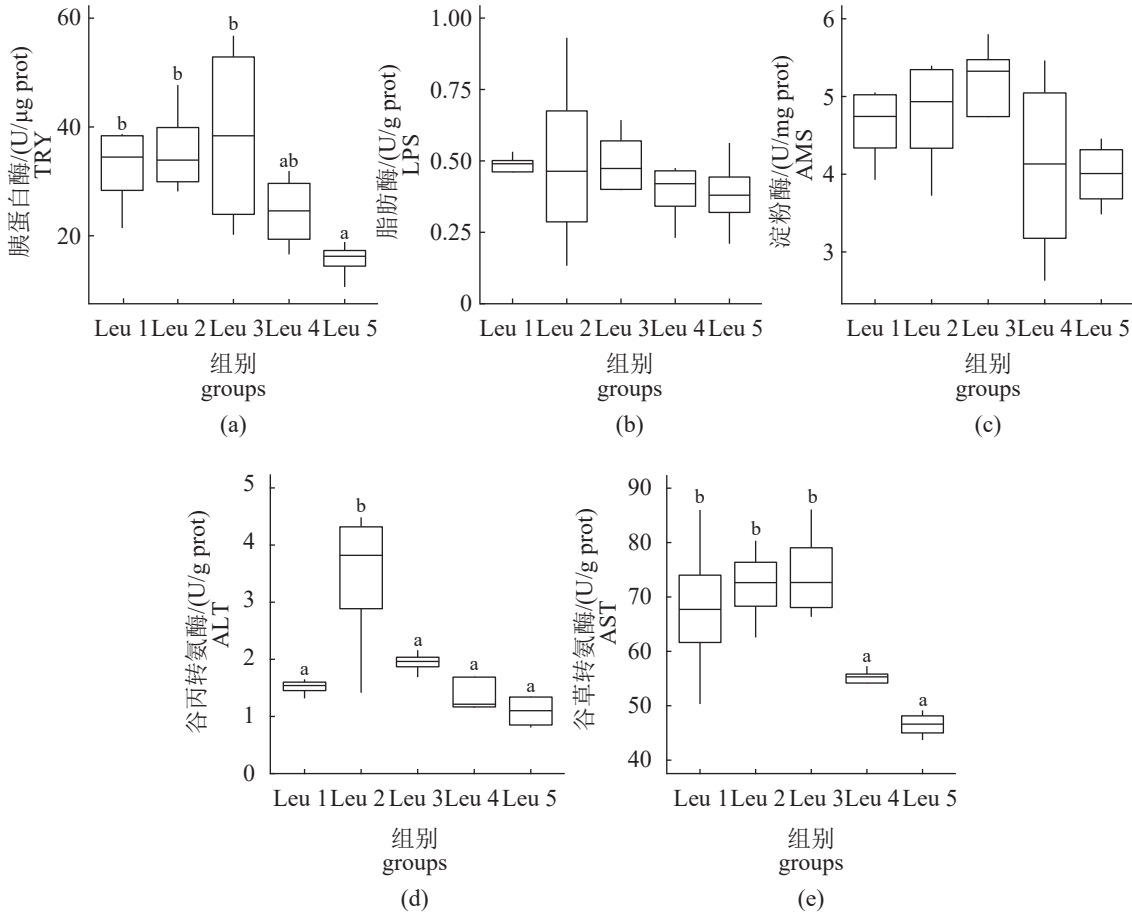


图 2 饲料亮氨酸水平对拟穴青蟹肝胰腺消化酶 (a)~(c) 和转氨酶 (d)~(e) 活性的影响

不同字母上标表示统计学差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Fig. 2 Effect of dietary leucine levels on hepatopancreatic digestive enzymes (a)-(c) and aminotransferase (d)-(e) activities of *S. paramamosain*

Different letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$), the same below.

LPS、TRY、AST、ALT、SOD 及 CAT 均呈正相关, 而与 MDA 呈负相关。相反, 弧菌属与上述多数指标 (FBW、WG、SGR、AMS、TRY、AST、ALT、SOD、CAT) 呈负相关, 与 MDA 呈正相关。发光杆菌属则与 SR、AMS、LPS、TRY、AST、ALT、TAOC、SOD 及 CAT 呈负相关, 与 MDA 呈正相关 (图 9)。

3 讨论

在本研究中, 拟穴青蟹的存活率为 96.43%~98.21%, 且未受饲料亮氨酸水平影响。类似结果已在三疣梭子蟹 (存活率 81.67%~88.33%)^[15] 和中华绒螯蟹 (存活率 81.08%~87.16%)^[16] 的研究中得到验证, 这表明蟹类对饲料亮氨酸水平具有较大耐受性, 在一定范围不会显著影响其存活率。

尽管饲料亮氨酸水平不影响拟穴青蟹存活, 但显著影响其生长性能。在饲料亮氨酸水平为 2.09%~2.66% 时, 拟穴青蟹的生长性能 (FBW、WGR 和 SGR) 达到最佳状态, 但当亮氨酸水平超过 2.99% 时则受到显著抑制。类似地, 当饲料亮氨酸水平超过 2.49% 时, 三疣梭子蟹的生长显著减缓^[15]。基于 WGR 的二阶多项式回归分析, 确定拟穴青蟹幼蟹的饲料亮氨酸最适需求量为 2.41%。该数值与三疣梭子蟹 (2.21%)^[15]、中华绒螯蟹 (2.36%~2.50%)^[16,27] 及凡纳对虾 (2.36%~2.67%)^[17,28-29] 相近, 高于斑节对虾 (*Penaeus monodon*, 1.70%)^[30] 和日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*, 1.70%)^[31] 的研究结果。这些结果表明, 甲壳动物亮氨酸需求量存在较大的种间差异。

水产动物的生长受营养素消化过程的影响。值得注意的是, 甲壳动物的消化生理过程主要由

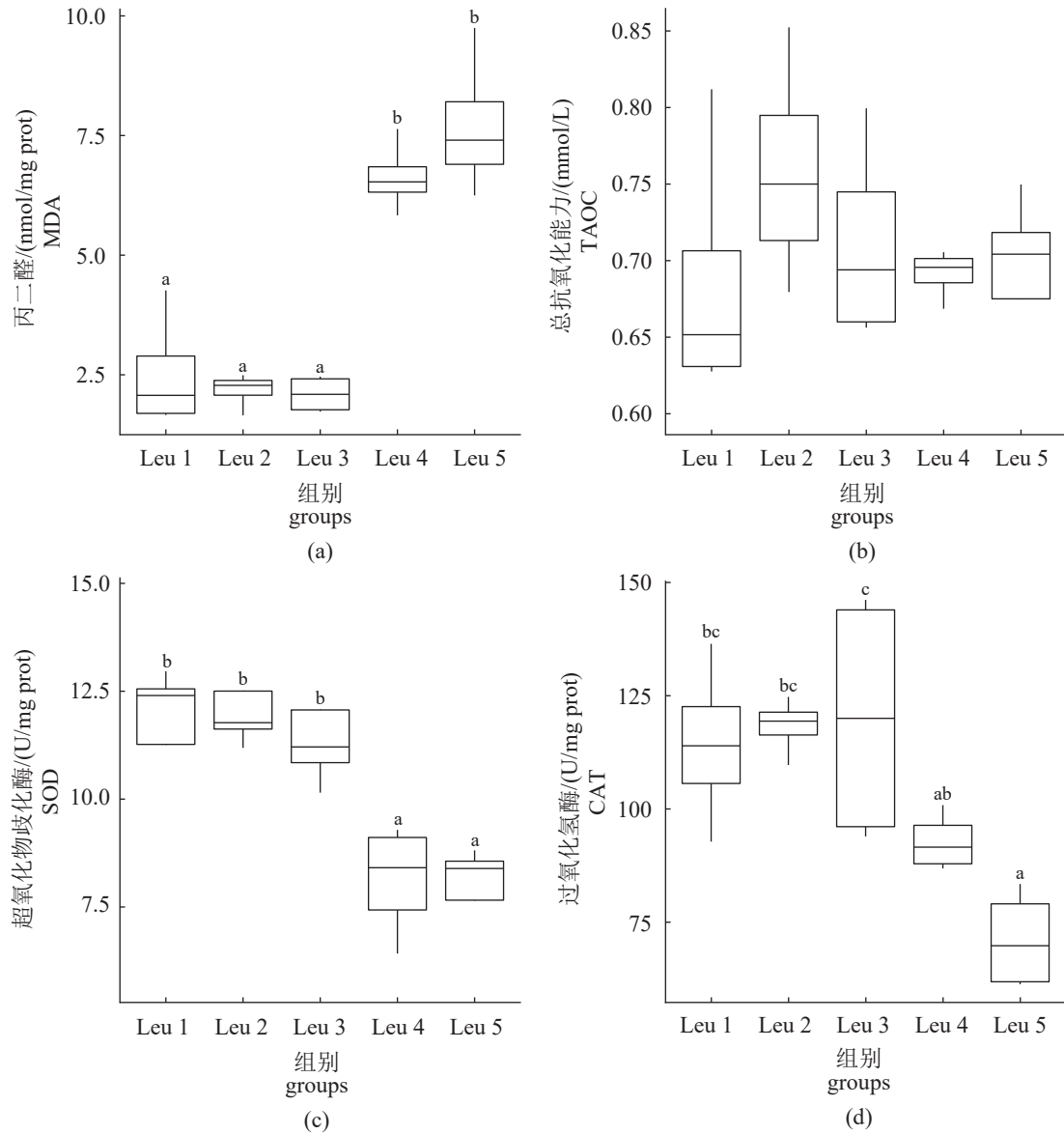


图 3 饲料亮氨酸水平对拟穴青蟹肝胰腺抗氧化能力的影响

Fig. 3 Effect of dietary leucine levels on hepatopancreatic antioxidant ability of *S. paramamosain*

肝胰腺完成——该器官由众多盲端小管构成，外覆纵向与环形肌纤维网络，其功能相当于鱼类的肠道^[32-33]。本研究显示，随着饲料亮氨酸水平升高，拟穴青蟹肝胰腺 TRY 活性呈先升后降趋势，并在 Leu 3 组达到峰值。类似现象在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 中亦有报道：随着饲料亮氨酸水平上升，消化道中 TRY 和糜蛋白酶活性均先上升后下降^[34]。在吉富罗非鱼 (GIFT, *Oreochromis niloticus*) 中，胃蛋白酶和肠蛋白酶活性同样随亮氨酸水平增加呈现先增后减的变化^[35]。研究认为，亮氨酸缺乏会抑制肠道发育^[14]，进而抑制消化酶活性，适宜的饲料亮氨酸水平通过提高肠道紧密

连接蛋白相关基因的表达^[14]，从而维持肠道黏膜细胞结构和功能完整，并提高了消化酶活性^[35]。本研究进一步通过分析肝胰腺中 AST 和 ALT 活性评估氨基酸代谢状况。作为氨基酸代谢的关键酶，AST 和 ALT 广泛分布于肝脏、心脏和肌肉等组织，其活性既可反映氨基酸代谢强度，也是肝脏 (肝胰腺) 功能状态的重要指标^[36]。本研究中，AST 与 ALT 活性均随饲料亮氨酸水平增加呈现先升后降趋势。三疣梭子蟹肝胰腺 AST 活性^[15]及建鲤 (*Cyprinus carpio* var. *jian*) 肝胰腺 AST、ALT 活性^[37]也报道过类似变化规律。综上，适宜的饲料亮氨酸水平可能通过提升 TRY、ALT 和 AST 活

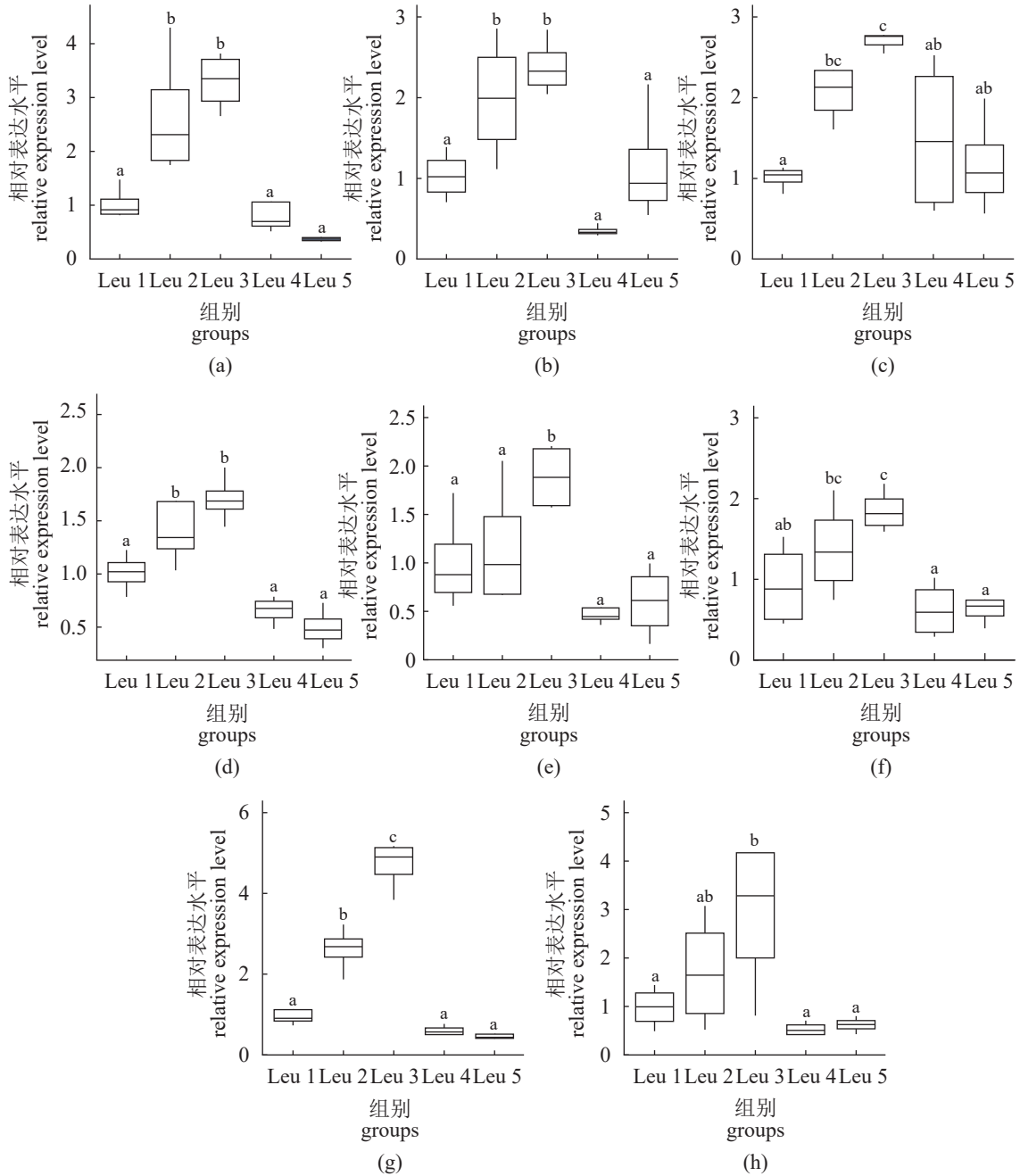


图 4 饲料亮氨酸水平对拟穴青蟹基因表达的影响

Fig. 4 Effect of dietary leucine levels on gene expression of *S. paramamosain*

(a) *akt*, (b) *tor*, (c) *s6k1*, (d) *4ebp21*, (e) *4ebp22*, (f) *eif4e2*, (g) *proPO*, (h) *lzm*.

性, 增强拟穴青蟹的蛋白质消化与氨基酸代谢能力, 从而改善生长性能。

本研究显示, 随着饲料亮氨酸水平升高, 拟穴青蟹全蟹粗蛋白含量及 TOR 信号通路相关基因 (*akt*、*tor*、*s6k1*、*4e-bp21*、*4e-bp22*、*eif4e2*) 的转录水平均呈现先上升后下降的趋势。TOR 信号通路是蛋白质合成的重要调控枢纽^[38]。研究证实, 亮氨酸可激活 TOR 通路, 促使下游靶标 S6K1、

4E-BP1 和 eIF4E 复合体发生磷酸化, 从而共同调控细胞蛋白质合成^[39]。TOR 通过磷酸化 4E-BP1, 使其与帽结合蛋白 eIF4E 解离, 进而推动 eIF4E 复合体的形成。此外, mTORC1 可激活 S6K1, 后者通过磷酸化核糖体蛋白 S6(rpS6) 增强核糖体蛋白基因的表达^[40]。类似地, 适宜水平的饲料亮氨酸也在中华绒螯蟹^[16] 和凡纳对虾^[17] 中激活了 TOR 通路并促进蛋白质合成。类似的结果在鱼类

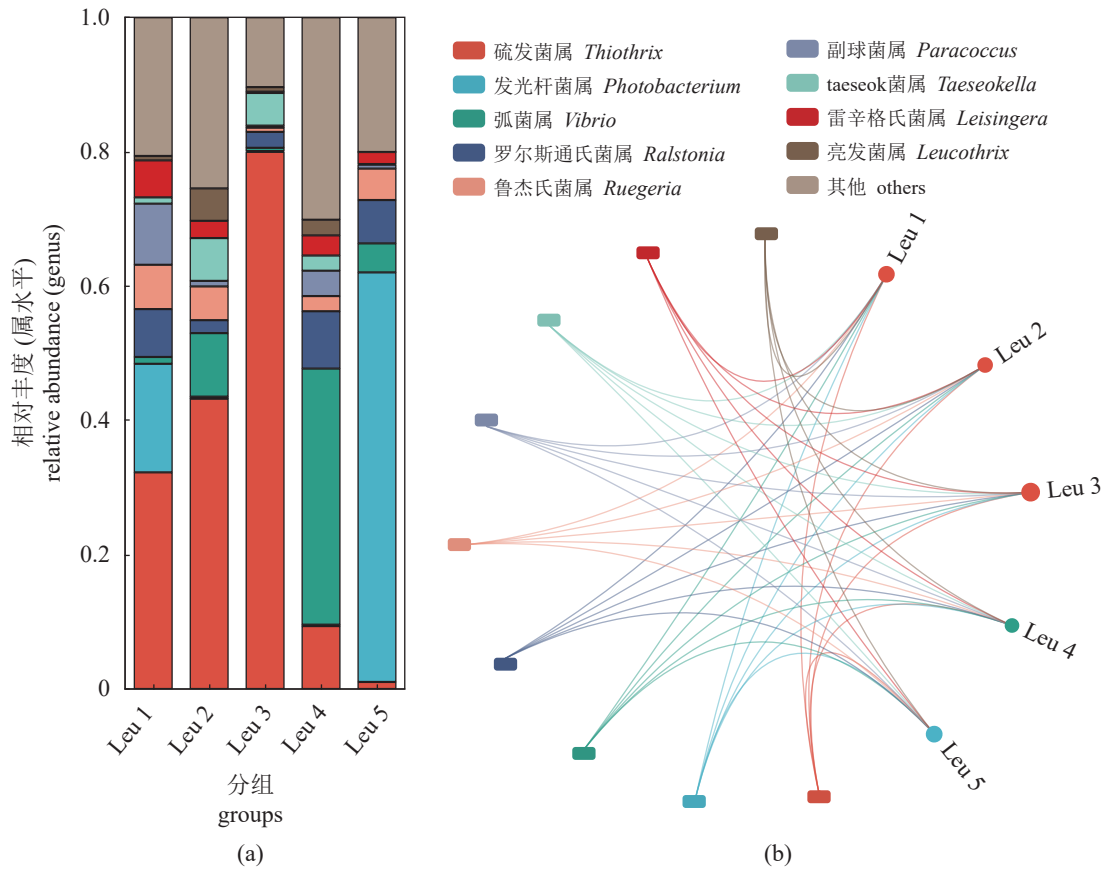


图 5 不同饲料亮氨酸水平拟穴青蟹肝胰腺细菌群落属水平 (>1%) 相对丰度图 (a) 和菌群组成弦图 (b)
Fig. 5 Relative abundance (>1%) of bacterial communities at the genus level (a) and chord diagram of microbial composition (b) in the hepatopancreas of *S. paramamosain* with different dietary leucine levels

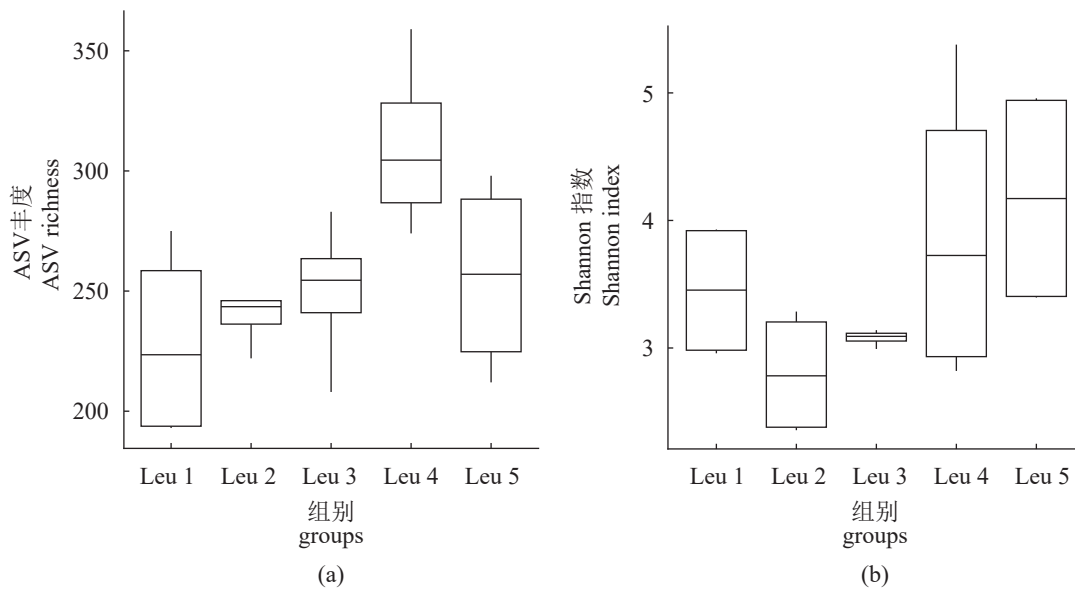


图 6 不同饲料亮氨酸水平拟穴青蟹肝胰腺细菌群落 ASV 丰度 (a) 和 Shannon 指数 (b)
Fig. 6 The ASV richness (a) and Shannon index (b) of bacterial communities in the hepatopancreas of *S. paramamosain* fed different dietary leucine levels

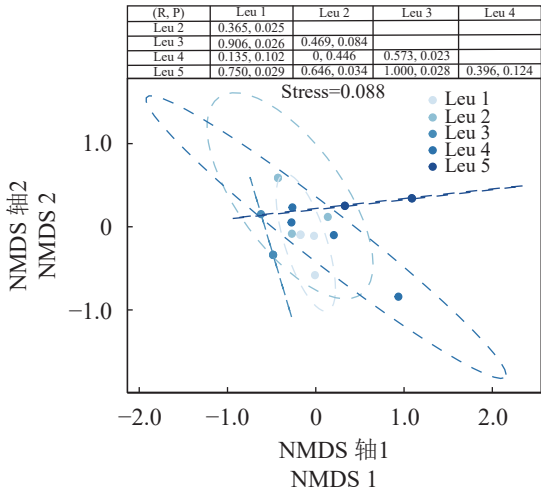


图 7 细菌群落结构 NMDS 聚类分析和相似性分析

Fig. 7 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) and analysis of similarities (ANOSIM) based on Bray-Curtis distance

中也被广泛报导, 如大菱鲆^[11]、大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*)^[41]、虹鳟^[34]、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)^[42]、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[43] 等。值得注意的是, 过高的亮氨酸水平会降低全蟹必需氨基酸含量, 尤其在 Leu 5 组中更为明显。具体而言, 精氨酸和赖氨酸含量随饲料亮氨酸水平上升而显著下降。在大口黑鲈的研究中, 高亮氨酸饲料同样导致全鱼和肌肉赖氨酸含量降低^[41, 44]。在三疣梭子蟹中, 尽管未达统计显著水平, 高亮氨酸仍引起肌肉精氨酸和赖氨酸含量下降^[15]。该现象可能与饲料氨基酸平衡有关: 亮氨酸、精氨酸和赖氨酸共同使用 yL 氨基酸转运系统^[45], 饲料亮氨酸摄入过高可能干扰精氨酸和赖氨酸的转运, 导致其在体内累积减少。

好氧生物在利用氧气代谢供能时会产生大量活性氧 (ROS), 这带来了普遍的氧化应激风险,

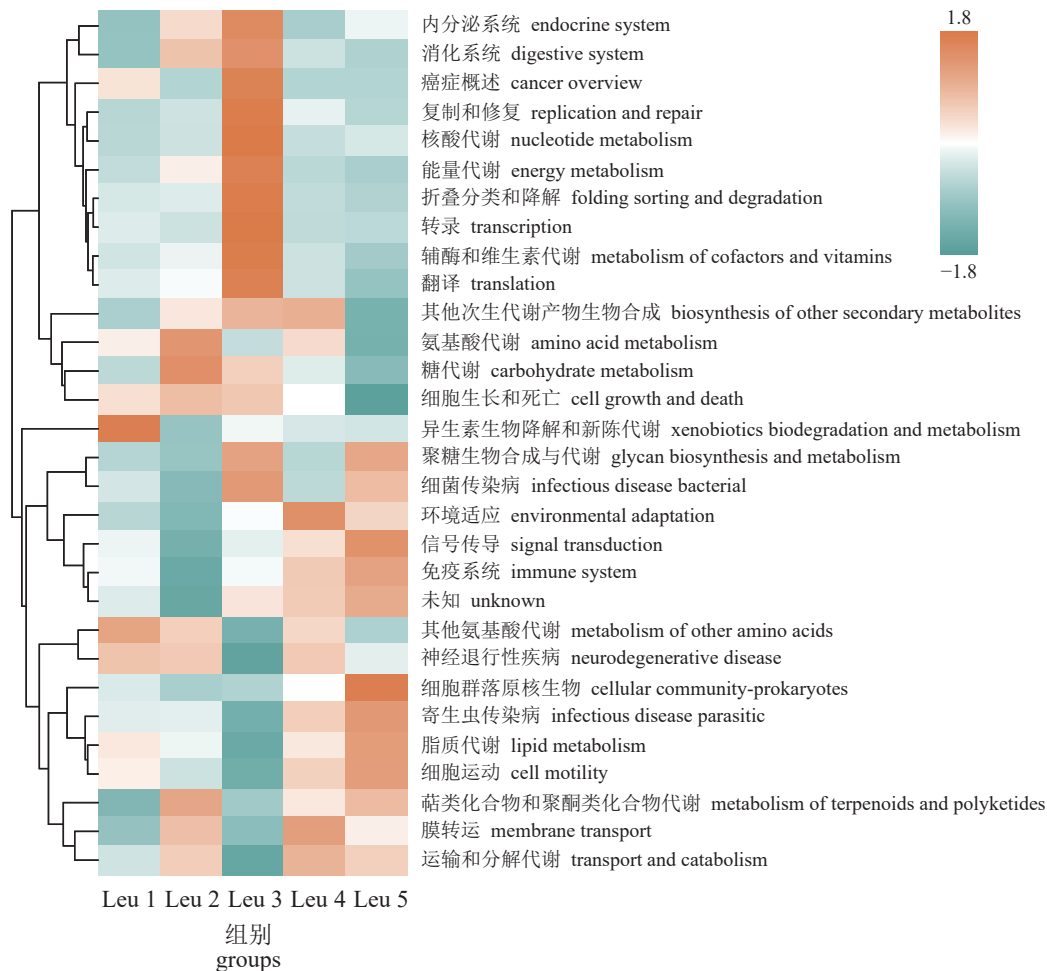


图 8 不同饲料亮氨酸水平拟穴青蟹肝胰腺细菌群落基于 PICRUS2 功能预测的 KEGG 富集分析

Fig. 8 KEGG enrichment analysis of hepatopancreatic bacterial communities based on PICRUS2 function prediction of the *S. paramamosain* with different dietary leucine levels

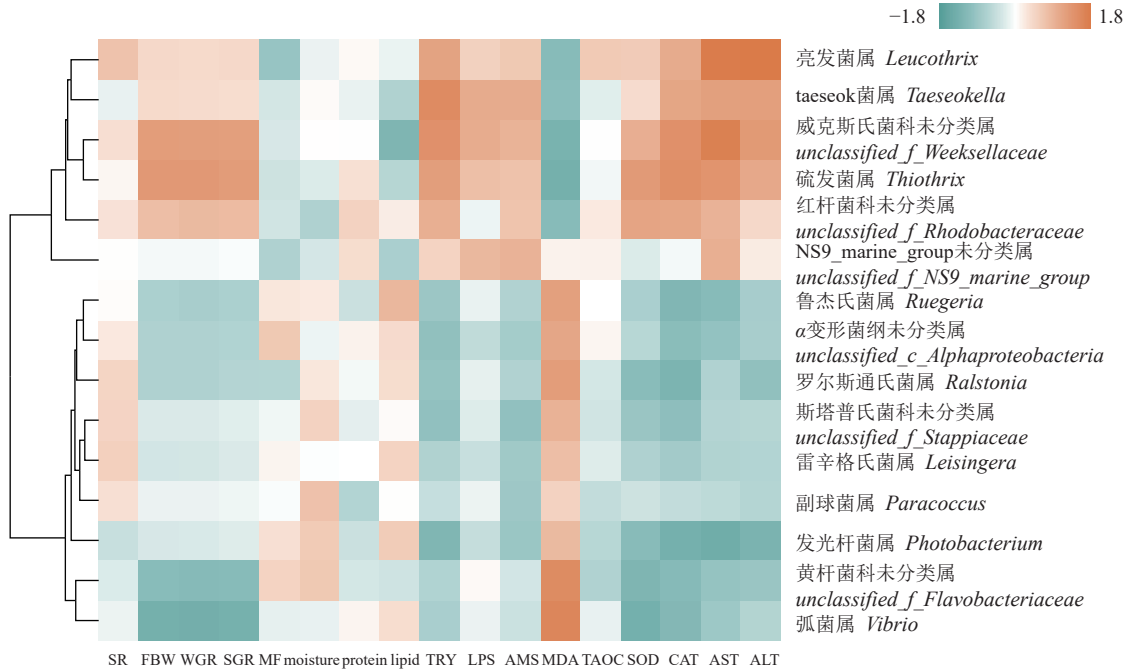


图 9 拟穴青蟹肝胰腺细菌群落与部分实验参数相关性分析

SR. 存活率, FBW. 末重, WGR. 增重率, SGR. 特定生长率, MF. 蜕壳频率, moisture. 全蟹水分含量, protein. 全蟹粗蛋白含量, lipid. 全蟹粗脂质含量, TRY. 胰蛋白酶, LPS. 脂肪酶, AMS. 淀粉酶, MDA. 丙二醛, TAOC. 总抗氧化能力, SOD. 超氧化物歧化酶, CAT. 过氧化氢酶, AST. 谷草转氨酶, ALT. 谷丙转氨酶。

Fig. 9 Correlation analysis of bacterial communities in hepatopancreas of the *S. paramamosain* with some experimental parameters

SR. survival rate, FBW. final body weight, WGR. weight gain rate, SGR. specific growth rate, MF. molting frequency, moisture. whole-crab moisture content, protein. whole-crab crude protein content, lipid. whole-crab crude lipid content, TRY. trypsin, LPS. lipase, AMS. amylase, MDA. malondialdehyde, TAOC. total-antioxidant capacity, SOD. superoxide dismutase, CAT. catalase, AST. aspartate aminotransferase, ALT. alanine aminotransferase.

正常情况下体内的抗氧化系统可清除过量 ROS, 维持机体稳态^[46]。SOD 和 CAT 是其体内重要的抗氧化酶。研究表明, 饲料营养素水平会显著影响水产动物的抗氧化系统功能^[47]。本研究显示, 投喂含 2.99% 与 3.34% 亮氨酸饲料的拟穴青蟹, 其肝胰腺 MDA 含量显著高于其他饲料组, 同时伴随 SOD 和 CAT 活性的显著降低。作为脂质过氧化终产物, MDA 水平升高标志着机体氧化损伤程度加剧^[23]。由此可见, 过量亮氨酸会诱发氧化损伤, 该结果与三疣梭子蟹中的研究结论一致^[15]。

由于缺乏适应性免疫系统, 甲壳动物主要依靠先天免疫系统抵御病原体^[48]。酚氧化酶原 (proPO) 系统是先天免疫的核心组成部分, 在免疫应答中起关键作用^[49]。先天免疫的有效性也依赖于直接效应机制, 其中溶菌酶作为重要的免疫效应蛋白, 可通过裂解病原体细胞壁介导抗菌反应, 是甲壳动物免疫防御的关键机制^[50]。在本研究中, 适宜的饲料亮氨酸水平 (2.39%~2.66%) 显著提高了 proPO 和 lzm 基因的表达, 表明适宜的亮氨酸

能提高拟穴青蟹的免疫力和抗菌能力。同样, 适宜的饲料亮氨酸水平显著提高了三疣梭子蟹酚氧化酶活性^[15]。

鉴于甲壳动物肝胰腺关键的生理代谢作用, 本研究进一步通过 16S rRNA 基因的高通量测序分析了肝胰腺菌群结构。结果显示, 硫发菌属的丰度随饲料亮氨酸水平升高呈先增后降趋势, 并在 Leu 3 组 (2.66% 亮氨酸) 达到峰值。前期研究发现, 在投喂含 1.58% 缬氨酸 (最适水平) 饲料的拟穴青蟹肝胰腺中, 硫发菌属为优势菌属^[23]。类似地, 在中华绒螯蟹中, 硫发菌属丰度与生长性能呈正相关^[51]。该菌属已被证实可将硫化氢 (H₂S)、硫代硫酸盐等还原性硫化物氧化为硫酸盐^[52]。由此推测肝胰腺中的硫发菌属可能通过参与有毒硫化物的解毒过程促进宿主生长。这种跨物种一致性表明, 硫发菌属介导的硫代谢通路或是调控宿主生长的潜在靶标, 需通过硫化物解毒效率测定进一步验证。值得注意的是, 在 Leu 4 组, 弧菌属丰度显著上升并成为优势菌属, 而在 Leu 5 组

的优势菌属则为发光杆菌属。弧菌是甲壳动物的关键致病菌, 可通过分泌毒素导致肠道损伤, 引发以肝胰腺坏死为特征的致死性疾病^[53-54]。发光杆菌是另一类重要海洋病原体^[55], 其宿主范围已扩展至甲壳动物, 最新研究表明, 某些发光杆菌菌株可感染拟穴青蟹并引发致死性疾病^[56]。在本研究中, 基于 NMDS 和 ANOSIM, 饲料亮氨酸水平显著影响了拟穴青蟹肝胰腺细菌的群落结构。已有多项研究报道, 不同饲料组成会显著改变拟穴青蟹肠道菌群结构^[57-59]。

肝胰腺菌群功能预测结果表明, Leu 3 组微生物功能主要富集于内分泌系统、消化系统、复制和修复、核酸代谢、能量代谢、转录、辅酶和维生素代谢及翻译等相关通路。肠道菌群作为高效的“外部消化器官”, 可分泌多种酶类分解宿主无法独立代谢的营养素(如膳食纤维)^[60]。此外, 肠道菌群还能调节宿主消化酶的分泌与活性^[61]。与之相应, Leu 3 组肝胰腺中检测到较高水平的消化酶活性。既往研究亦证实肠道菌群是 B 族维生素的重要来源^[62], 并能调节维生素 D 代谢^[63]。Leu 3 组肝胰腺菌群中更活跃的辅酶和维生素代谢可能为拟穴青蟹提供更多维生素, 从而促进生长。而复制和修复、核酸代谢、能量代谢、转录、翻译等功能的富集, 则表明在此亮氨酸水平 (Leu 3 组) 下, 肝胰腺细菌处于适宜环境, 表现出更活跃的增殖与代谢状态。

相关性分析表明, 拟穴青蟹的生长性能、消化酶活性、转氨酶活性及抗氧化酶活性均与硫发菌属和红杆菌科未分类属呈正相关, 而与弧菌属和黄杆菌科未分类属 (*unclassified_f_Flavobacteriaceae*) 呈负相关。虾蟹类研究发现, 红杆菌科在促进宿主生长、维持肠道菌群结构稳定及抑制病原体方面发挥积极作用^[64]。在凡纳对虾中, 红杆菌科对弧菌属和假单胞菌科等条件致病菌具有拮抗作用^[65-66]。最新三疣梭子蟹研究证实, 饲料添加海滨玫瑰变色菌 (*Roseovarius litoreus*) (红杆菌科成员) 可改变肠道菌群结构, 增加有益菌 [羧基杆菌属 (*Carboxylicivirga*) 和玫瑰变色菌属 (*Roseovarius*)] 丰度, 降低致病菌 (如发光杆菌属和弧菌属) 丰度, 从而提升副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 攻毒后的存活率与免疫力^[67]。黄杆菌科则是鱼类的常见病原菌^[68-69], 并与青蟹幼体死亡相关^[70]。这些结果共同表明, 适宜亮氨酸水平 (2.09%~2.66%) 能促进有益菌群(硫发菌属和红杆

菌科) 的生长, 而过量亮氨酸会破坏菌群平衡, 导致潜在致病菌 (弧菌属、发光杆菌属和黄杆菌科) 增殖, 最终引发生长抑制问题。

4 结论

本研究发现, 适宜水平的饲料亮氨酸 (2.39%~2.66%) 可激活 TOR 信号通路相关基因的转录, 提升肝胰腺消化酶和转氨酶活性, 进而促进拟穴青蟹幼蟹的生长。同时, 2.09%~2.66% 的亮氨酸水平能显著提升抗氧化酶活性并降低肝胰腺 MDA 含量, 上调免疫相关基因的表达。饲料亮氨酸水平还显著影响肝胰腺菌群结构, 2.09%~2.66% 亮氨酸组有益菌占比更高, 而 2.99%~3.34% 亮氨酸则导致潜在致病菌 (弧菌属、发光杆菌属) 显著增殖。基于 WGR 的二次多项式回归分析, 确定拟穴青蟹幼蟹饲料亮氨酸最适需求量为 2.41%。需要指出的是, 本研究未考虑亮氨酸与其他支链氨基酸 (异亮氨酸、缬氨酸) 之间的交互作用。这类交互可能影响机体对单一氨基酸的利用效率与生理效应, 因此未来研究需系统分析支链氨基酸间的平衡, 以实现饲料中的精准配比。

(作者声明本文无利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Li P, Mai K, Trushenski J, et al. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds[J]. *Amino Acids*, 2009, 37(1): 43-53.
- [2] Esmaceli N, Ma H Y, Kadri S, et al. Protein and lipid nutrition in crabs[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2024, 16(4): 1499-1519.
- [3] Neinast M, Murashige D, Arany Z. Branched chain amino acids[J]. *Annual Review of Physiology*, 2019, 81(1): 139-164.
- [4] 张圆圆, 王连生. 水产动物亮氨酸营养研究进展 [J]. *动物营养学报*, 2020, 32(12): 5516-5523.
Zhang Y Y, Wang L S. Research progress of leucine nutrition in aquatic animals[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(12): 5516-5523 (in Chinese).
- [5] Li F N, Yin Y L, Tan B, et al. Leucine nutrition in animals and humans: mTOR signaling and beyond[J]. *Amino Acids*, 2011, 41(5): 1185-1193.
- [6] Rehman S U, Ali R, Zhang H, et al. Research progress in the role and mechanism of leucine in regulating animal growth and development[J]. *Frontiers in Physiology*, 2023, 14: 1252089.
- [7] Zhang R R, Mu H N, Li Z Y, et al. Oral administration of

- branched-chain amino acids ameliorates high-fat diet-induced metabolic-associated fatty liver disease *via* gut microbiota-associated mechanisms[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 920277.
- [8] Liu R, Yang Y, Shi G J, *et al.* Branched-chain amino acid supplementation drives dynamic changes in gut microbiota without impairing glucose and lipid homeostasis at the different stages of insulin resistance in mice on a high-fat diet[J]. *Nutrition*, 2024, 123: 112410.
- [9] Li X Y, Han T, Zheng S X, *et al.* Nutrition and functions of amino acids in aquatic crustaceans[M]//Wu G Y. Amino acids in nutrition and health: amino acids in the nutrition of companion, zoo and farm animals. Cham: Springer, 2021: 169-198.
- [10] Mai K S, Xue M, He G, *et al.* Protein and amino acids[M]//Hardy R W, Kaushik S J. Fish nutrition. Amsterdam: Elsevier, 2022: 181-302.
- [11] Sui Z, Wang N, Zhang X J, *et al.* Comprehensive study on the effect of dietary leucine supplementation on intestinal physiology, TOR signaling and microbiota in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 141: 109060.
- [12] Jiang W D, Deng Y P, Liu Y, *et al.* Dietary leucine regulates the intestinal immune status, immune-related signalling molecules and tight junction transcript abundance in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Aquaculture*, 2015, 444: 134-142.
- [13] Deng Y P, Jiang W D, Liu Y, *et al.* Dietary leucine improves flesh quality and alters mRNA expressions of Nrf2-mediated antioxidant enzymes in the muscle of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Aquaculture*, 2016, 452: 380-387.
- [14] Tan X H, Lin H Z, Huang Z, *et al.* Effects of dietary leucine on growth performance, feed utilization, non-specific immune responses and gut morphology of juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus* [J]. *Aquaculture*, 2016, 465: 100-107.
- [15] Huo Y W, Jin M, Sun P, *et al.* Effect of dietary leucine on growth performance, hemolymph and hepatopancreas enzyme activities of swimming crab, *Portunus trituberculatus* [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2017, 23(6): 1341-1350.
- [16] Song M Q, Yu Q R, Li E C, *et al.* Leucine improves dietary protein use efficiency by regulating protein synthesis by activating amino acid transporters and the mTORC1 pathways in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Aquaculture*, 2024, 581: 740423.
- [17] Wei Z L, Zhuang Y T, Liu X T, *et al.* Leucine promotes protein synthesis of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* through TOR signaling pathway [J]. *Aquaculture*, 2023, 564: 739060.
- [18] Xu H Y, Liu T, Feng W P, *et al.* Evaluation of the dietary taurine requirement for early juvenile mud crab *Scylla paramamosain* [J]. *Aquaculture*, 2024, 586: 740754.
- [19] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴-2025 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2025: 22.
- The Fisheries and Fishery Administration Bureau of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Aquaculture Technology Promotion Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2025 [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2025: 22 (in Chinese).
- [20] Wu D T, Feng W P, Li X Y, *et al.* Effect of dietary arginine levels on growth performance, protein synthesis, antioxidant capacity and immunity of postlarval mud crab *Scylla paramamosain* [J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 1025879.
- [21] Wu D T, Xu H Y, Feng W P, *et al.* Optimal dietary lysine improves the growth performance, molting frequency, lipid metabolism, immunity and antioxidant of postlarval mud crab *Scylla paramamosain* [J]. *Aquaculture*, 2024, 579: 740145.
- [22] Feng W P, Zhao Z P, Xu H Y, *et al.* Assessing the role of tryptophan supplementation in enhancing growth, reducing aggression, and boosting immunity in juvenile *Scylla paramamosain* [J]. *Aquaculture Reports*, 2024, 39: 102383.
- [23] 王骥腾, 吴正球, 陶如冰, 等. 拟穴青蟹幼蟹饲料缬氨酸需求量评估 [J]. *水产学报*, 2025, 49(9): 099615.
- Wang J T, Wu Z Q, Tao R B, *et al.* Evaluation of the dietary valine demand for juvenile mud crabs (*Scylla paramamosain*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2025, 49(9): 099615 (in Chinese).
- [24] Luan X Y, Li X Y, He J L, *et al.* Effects of arginine family amino acids supplementation on growth, whole-body amino acid profiles, antioxidant capacity, and gene expression of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Aquaculture*, 2025, 594: 741312.
- [25] Latimer G W Jr. Official methods of analysis of AOAC international [M]. 22nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2023.
- [26] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [27] 杨霞, 叶金云, 周志金, 等. 中华绒螯蟹幼蟹对亮氨酸和异亮氨酸的需要量 [J]. *水生生物学报*, 2014, 38(6): 1062-1070.
- Yang X, Ye J Y, Zhou Z J, *et al.* Study on the optimal levels of dietary leucine and isoleucine for juvenile Chinese mitten crabs,

- Eriocheir sinensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(6): 1062-1070 (in Chinese).
- [28] 王用黎. 凡纳滨对虾幼虾对苏氨酸、亮氨酸、色氨酸和缬氨酸需要量的研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2013: 37-48.
Wang Y L. Study on the requirements of threonine, leucine, tryptophan and valine for juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2013: 37-48 (in Chinese).
- [29] Liu F J, Liu Y J, Tian L X, *et al.* Quantitative dietary leucine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared in low-salinity water[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2014, 20(3): 332-340.
- [30] Millamena O M, Teruel M B, Kanazawa A, *et al.* Quantitative dietary requirements of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon*, for histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine and tryptophan[J]. *Aquaculture*, 1999, 179(1-4): 169-179.
- [31] Teshima S, Alam M S, Koshio S, *et al.* Assessment of requirement values for essential amino acids in the prawn, *Marsupenaeus japonicus* (Bate)[J]. *Aquaculture Research*, 2002, 33(6): 395-402.
- [32] Vogt G. Functional cytology of the hepatopancreas of decapod crustaceans[J]. *Journal of Morphology*, 2019, 280(9): 1405-1444.
- [33] Vogt G. Synthesis of digestive enzymes, food processing, and nutrient absorption in decapod crustaceans: a comparison to the mammalian model of digestion[J]. *Zoology*, 2021, 147: 125945.
- [34] Ahmad I, Ahmed I, Dar N A. Effects of dietary leucine levels on growth performance, hematobiochemical parameters, liver profile, intestinal enzyme activities and target of rapamycin signalling pathway related gene expression in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* fingerlings[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2021, 27(6): 1837-1852.
- [35] 石亚庆, 孙玉轩, 罗莉等. 吉富罗非鱼亮氨酸需求量研究 [J]. *水产学报*, 2014, 38(10): 1778-1785.
Shi Y Q, Sun Y X, Luo L, *et al.* Dietary leucine requirement of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(10): 1778-1785 (in Chinese).
- [36] 王香丽, 麦康森, 徐玮, 等. 蛋氨酸对凡氏黄颡鱼幼鱼肝脏及血浆中谷草转氨酶和谷丙转氨酶活力的影响 [J]. *中国海洋大学学报*, 2015, 45(9): 49-53.
Wang X L, Mai K S, Xu W, *et al.* Influence of dietary methionine on the activity of liver and plasma glutamic-pyruvic and glutamic oxalacetic transaminases of juvenile darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*)[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2015, 45(9): 49-53 (in Chinese).
- [37] 伍曦. 亮氨酸对幼建鲤生长性能和免疫功能的影响 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2011: 21.
Wu X. Effects of leucine on growth performance and immune of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. jian)[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2011: 21 (in Chinese).
- [38] Feng L, Peng Y, Wu P, *et al.* Threonine affects intestinal function, protein synthesis and gene expression of TOR in Jian carp (*Cyprinus carpio* var. jian)[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69974.
- [39] Kimball S R, Jefferson L S. New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2006, 83(2): 500S-507S.
- [40] Ma X M, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(5): 307-318.
- [41] Yang H, Rahman M M, Li X Q, *et al.* Dietary leucine requirement of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) based on growth, nutrient utilization and growth-related gene analyses[J]. *Aquaculture*, 2022, 555: 738207.
- [42] 钱晓丽. 饲料亮氨酸水平对斜带石斑鱼生长及其 mTOR 信号通路的影响 [D]. 厦门: 集美大学, 2018: 34-48.
Qian X L. Effects of Leucine levels in diets on the growth and mTOR signaling pathway of grouper (*Epinephelus coioides*) [D]. Xiamen: Jimei University, 2018: 34-48 (in Chinese).
- [43] Ren M C, Habte-Tsion H M, Liu B, *et al.* Dietary leucine level affects growth performance, whole body composition, plasma parameters and relative expression of TOR and TNF- α in juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. *Aquaculture*, 2015, 448: 162-168.
- [44] Yang H, Li X Q, Rahman M M, *et al.* Dietary supplementation of leucine improved the flesh quality of largemouth bass, *Micropterus salmoides* through TOR, FoxO3a and MRFs regulation[J]. *Aquaculture*, 2023, 566: 739237.
- [45] Wu G Y. Amino acids: biochemistry and nutrition[M]. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2021: 89.
- [46] Birmie-Gauvin K, Costantini D, Cooke S J, *et al.* A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review[J]. *Fish and Fisheries*, 2017, 18(5): 928-942.
- [47] Hoseinifar S H, Yousefi S, Van Doan H, *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense in fish: the implications of probiotic, prebiotic, and synbiotics[J]. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 2021, 29(2): 198-217.
- [48] Chen F Y, Wang K J. Characterization of the innate immunity in the mud crab *Scylla paramamosain*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 436-448.
- [49] Cerenius L, Söderhäll K. Immune properties of invertebrate

- phenoloxidases[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 122: 104098.
- [50] Xie J W, Cheng C H, Ma H L, *et al.* Molecular characterization, expression and antimicrobial activities of a c-type lysozyme from the mud crab, *Scylla paramamosain*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 98: 54-64.
- [51] Yang Z F, Cao H Y, Wang J G, *et al.* Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* supplementation on growth performance, antioxidant properties, and gut microbiota alterations on Chinese mitten crab, *Eriocheir Sinensis*[J]. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 2024, 76(4): 316-326.
- [52] Ravin N V, Rudenko T S, Smolyakov D D, *et al.* History of the study of the genus *Thiothrix*: from the first enrichment cultures to pangenomic analysis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(17): 9531.
- [53] Li L Z, Meng H M, Gu D, *et al.* Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis[J]. *Microbiological Research*, 2019, 222: 43-51.
- [54] De Souza Valente C, Wan A H L. *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2021, 181: 107527.
- [55] Rivas A J, Lemos M L, Osorio C R. *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 283.
- [56] Xie J S, Mei H, Jin S, *et al.* First report of *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* infection in the mud crab *Scylla paramamosain* cultured in China[J]. *Aquaculture*, 2021, 530: 735880.
- [57] Tran N T, Tang Y, Li Z Z, *et al.* Galactooligosaccharides and resistant starch altered microbiota and short-chain fatty acids in an *in vitro* fermentation study using gut contents of mud crab (*Scylla paramamosain*)[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1352.
- [58] Luo J X, Zhang Y Y, Zhou Q C, *et al.* Dietary soybean oil aggravates the adverse effects of low salinity on intestinal health in juvenile mud crab *Scylla paramamosain*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 213: 112004.
- [59] Ye Z H, Liu J J, Cui S H, *et al.* Emulsifier is beneficial for declining dietary lipid requirement of aquatic crustaceans by accelerating the absorption, transport and deposition of lipids: a case study in mud crab (*Scylla paramamosain*)[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2025, 326: 116389.
- [60] Hussein S, Yu X Y, Farouk M H, *et al.* The role effects of dietary fiber on intestinal microbial composition and digestive physiological functions of pigs: a review[J]. *Indian Journal of Animal Research*, 2021, 55(7): 737-743.
- [61] Assan D, Kuebutornye F K A, Hlordzi V, *et al.* Effects of probiotics on digestive enzymes of fish (finfish and shellfish); status and prospects: a mini review[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2022, 257: 110653.
- [62] Magnúsdóttir S, Ravcheev D, De Crécy-Lagard V, *et al.* Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes[J]. *Frontiers in Genetics*, 2015, 6: 148.
- [63] Thomas R L, Jiang L J, Adams J S, *et al.* Vitamin D metabolites and the gut microbiome in older men[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 5997.
- [64] Wang Y T, Wang K, Huang L, *et al.* Fine-scale succession patterns and assembly mechanisms of bacterial community of *Litopenaeus vannamei* larvae across the developmental cycle[J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 106.
- [65] Dong P S, Guo H P, Wang Y T, *et al.* Gastrointestinal microbiota imbalance is triggered by the enrichment of *Vibrio* in subadult *Litopenaeus vannamei* with acute hepatopancreatic necrosis disease[J]. *Aquaculture*, 2021, 533: 736199.
- [66] Fu X Z, He J K, Wang J, *et al.* Specific gut bacterial taxa inhabited in healthy shrimp (*Penaeus vannamei*) confer protection against *Vibrio parahaemolyticus* challenge[J]. *Aquaculture*, 2024, 579: 740192.
- [67] Niu M M, Lin W C, Wu Q Y, *et al.* Dietary supplementation of *Roseovarius litoreus* improves survival and immune defense of the swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. *Aquaculture*, 2025, 595: 741564.
- [68] Loch T P, Faisal M. Emerging flavobacterial infections in fish: a review[J]. *Journal of Advanced Research*, 2015, 6(3): 283-300.
- [69] Harrison C E, LaFrentz B R, Shoemaker C A, *et al.* An overview of vaccine development strategies for columnaris-causing bacteria in cultured fish[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2025, 48(8): e14155.
- [70] Dan S, Hamasaki K. Evaluation of the effects of probiotics in controlling bacterial necrosis symptoms in larvae of the mud crab *Scylla serrata* during mass seed production[J]. *Aquaculture International*, 2015, 23(1): 277-296.

Dietary leucine requirement of juvenile mud crab (*Scylla paramamosain*)

XU Hanying, CAO Yiwen, WU Zhengqiu, WANG Jiteng, TAO Rubing, FENG Wenping,
SUN Yulong, DONG Fen, CHEN Qiang, HAN Tao*

(School of Fishery, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China)

Abstract: The mud crab (*Scylla paramamosain*) is the most farmed marine crab species in China. However, the lack of systematic research on its nutritional requirements has hindered the development of high-quality complete formulated feeds, which poses a major bottleneck to achieving sustainable, efficient, and green development of the industry. This study aimed to determine the optimal dietary leucine requirement for juvenile mud crabs *S. paramamosain* [initial weight of (15.07±0.97) mg]. Five isonitrogenous and isoenergetic diets were formulated with leucine levels of 2.09% (Leu 1), 2.39% (Leu 2), 2.66% (Leu 3), 2.99% (Leu 4), and 3.34% (Leu 5). After an 8-week feeding trial, crabs fed diets with leucine levels between 2.09% and 2.66% exhibited significantly improved growth performance, including final body weight (FBW), weight gain (WG), and specific growth rate (SGR). However, growth was significantly suppressed when leucine levels exceeded 2.99%. At the physiological level, appropriate leucine supplementation (2.09%-2.66%) enhanced digestive enzyme [trypsin (TRY)] and metabolic enzyme [alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST)] activities in the hepatopancreas. Concurrently, the expression of key genes in the TOR signaling pathway (*tor*, *akt*, *s6k1*, *eif4e2*, *4e-bp21*) was significantly upregulated. In contrast, excessive leucine (2.99%-3.34%) induced oxidative stress, as evidenced by suppressed antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT)] activities and elevated malondialdehyde (MDA) content. Immune-related gene expressions [lysozyme (*lzm*) and prophenoloxidase (*proPO*)] were also inhibited. Analysis of the hepatopancreatic microbiota revealed that optimal leucine levels promoted a higher abundance of *Thiothrix*, which was positively correlated with growth indicators, digestive and metabolic enzyme activity, and antioxidant capacity. Conversely, high leucine levels significantly increased the proportion of potential pathogens like *Vibrio* and *Photobacterium*, which were associated with oxidative damage. Based on a second-order polynomial regression model of WG, the optimal dietary leucine requirement for juvenile *S. paramamosain* was determined to be 2.41%. This study addresses the gap in key nutrient requirements data for juvenile *S. paramamosain*, laying an important theoretical foundation for the development of high-quality formulated diet.

Key words: *Scylla paramamosain*; leucine; growth performance; antioxidant capacity; hepatopancreatic microorganisms

Corresponding author: HAN Tao. E-mail: goodhantao@gmail.com

Funding projects: Ten-thousand Talents Plan of Zhejiang Province (2022R52021); Key Scientific and Technological Grant of Zhejiang for Breeding New Agricultural Varieties (2021C02069-6); Scientific Research Fund of Zhejiang Provincial Education Department (Y202457266); Fundamental Research Funds for Zhejiang Provincial Universities and Research Institutes (2024J004-3)