

日粮中不同核黄素水平对日本沼虾生长性能和代谢机能的影响

钱香钰¹, 李向飞¹, 张玲¹, 陈伟亮¹, 刘子上¹,
孙存鑫², 刘波², 刘文斌^{1*}

(1. 南京农业大学动物科技学院, 江苏省水产营养重点实验室, 江苏 南京 210095;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

摘要: 采用单因素实验设计, 探究了日粮中不同水平核黄素对日本沼虾生长性能和代谢机能的影响。挑选 1 200 尾均重为 (0.68±0.01) g 的日本沼虾, 随机分为 6 组, 每组 4 个重复, 每重复 50 尾。配制 6 组半纯化饲料, 测得其实际核黄素含量分别为 3.91、20.53、49.18、87.80、169.61 和 326.66 mg/kg。于室内循环系统中进行为期 10 周的正式养殖实验。结果显示: ① 169.61 mg/kg 核黄素组终末体重、增重率、特定生长率、蛋白质效率、血淋巴丙酮酸以及肝胰腺核黄素含量均显著高于其他各组, 而采食量、饵料系数和血浆尿素氮含量均显著低于其他组。以增重率和肝胰腺核黄素含量为评价指标, 建立回归模型分析, 得出日本沼虾适宜核黄素需求量为 165.25~180.31 mg/kg。② 169.61 mg/kg 核黄素组的肝胰腺葡萄糖转运体 2、己糖激酶、丙酮酸激酶、激素敏感性脂肪酶、谷氨酸脱氢酶与谷氨酰胺合酶的 mRNA 表达量显著高于缺乏组和过量组。丙酮酸羧化酶、脂肪酸合成酶、乙酰辅酶 A 羧化酶的 mRNA 表达量在 169.61 mg/kg 组达到谷值。研究表明, 在饲料中添加 165.25~180.31 mg/kg 的核黄素能够改善日本沼虾的生长性能和饲料利用率, 并显著上调糖酵解、脂肪酸 β-氧化和蛋白质合成等过程。本研究初步阐明了核黄素改善日本沼虾生长性能与代谢机能的分子机制, 可为日本沼虾营养需求数据库构建及高效配合饲料的研发提供技术指导。

关键词: 日本沼虾; 核黄素; 生长性能; 代谢机能

中图分类号: S 963.73⁺¹

文献标志码: A

核黄素是一种 B 族维生素, 又称维生素 B₂, 广泛存在于干草、玉米、豆制品、叶类青饲料及鱼粉等饲料原料中。核黄素在动物机体内转化为黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 和黄素单核苷酸 (FMN), 并与特定蛋白质结合形成多种黄素蛋白酶^[1], 进而参与三羧酸循环、氧化磷酸化、脂肪酸 β-氧化、氨基酸脱氨与抗氧化等代谢过程^[2]。

然而水产动物自身不能合成核黄素, 一旦缺乏会出现相关缺乏症, 例如日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 会产生皮炎、畏光与鳍腹部充血等症状^[3]。莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 则表现出嗜眠、白内障与贫血等现象^[4]。斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 会呈现体色变浅、刺激过敏与表皮突起等症状^[5]。鉴于此, 国内外学者就不同水产

收稿日期: 2023-07-01 修回日期: 2023-07-28

资助项目: 江苏现代农业(青虾)产业技术体系 [JATS (2022) 514]; 国家虾蟹产业技术体系专项 (CARS-48)

第一作者: 钱香钰(照片), 从事水产动物营养与饲料科学研究, E-mail: qian_xiangyu5@163.com

通信作者: 刘文斌, 从事水产动物营养与饲料科学研究, E-mail: wblu@njau.edu.cn



动物适宜核黄素需求量进行了大量研究。姜建湖等^[6]研究发现, 在草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 幼鱼基础日粮中分别添加 5.54 与 5.99 mg/kg 核黄素时, 鱼体生长性能和肝胰脏 *D*-氨基酸氧化酶 (*D*-AAO) 活性最佳。王玥等^[7]根据增重率和 *D*-AAO 活力研究得出, 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 幼蟹的适宜核黄素需求量为 8.25~10.02 mg/kg。Chen 等^[5]研究表明, 当日粮中核黄素含量为 22.3 mg/kg 时, 斑节对虾幼虾的增重率和存活率最高。此外, 团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[8]、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)^[9]、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[10] 等的适宜核黄素需求量也有报道。然而, 已有研究大多局限于对生长性能和饲料利用率的考察, 同时, 哺乳动物相关研究表明, 高剂量核黄素具有降低血脂与防止脂质过氧化的效果^[11-12], 但是核黄素对水产动物代谢机能的调控作用目前尚不明确。

日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 又被称作青虾, 属于节肢动物门 (Arthropod) 长臂虾科 (Palaemonidae) 沼虾属 (*Macrobrachium*), 在东亚以及东南亚等地广泛分布^[13]。其具有肉质鲜嫩、适应性广、营养均衡等优点, 具有广阔的市场需求, 是我国浙江、江苏等地淡水养殖的主要经济虾类之一^[14]。然而, 目前关于日本沼虾适宜维生素需求量的研究相对较少, 仅有少数几种维生素的适宜需求量被确定, 如硫胺素^[15]、吡哆素和抗坏血酸^[16]、生育酚^[17]、肌醇^[18]、维生素 D₃^[19] 与烟酸^[20] 等。然而, 其适宜核黄素需求量的研究尚未见报道。鉴于此, 本实验探究了日粮中不同核黄素水平对日本沼虾生长性能和代谢机能的影响, 以期完善日本沼虾维生素营养需求数据库, 为其高效配合饲料的研发提供技术指导, 进而促进相关产业的发展。

糖代谢过程中, 葡萄糖不能自由通过细胞膜进入细胞, 因此血淋巴中的葡萄糖需要在葡萄糖转运体 2 (*glut2*) 的辅助下转运至胰腺进行代谢^[21], 其中己糖激酶 (*hk*) 和丙酮酸激酶 (*pk*) 在糖酵解中起关键作用, 而丙酮酸羧化酶 (*pyc*) 是糖异生途径中的重要限速酶。脂代谢进程中, 脂肪酸合酶 (*fas*) 和乙酰辅酶 A 羧化酶 (*acc*) 是调节脂肪酸生物合成的关键酶, 而激素敏感性脂肪酶 (*hsl*) 在脂肪酸 β -氧化中扮演重要角色。此外, 谷氨酸脱氢酶 (*gdh*) 可催化 NH_4^+ 生成谷氨酸, 谷氨酰胺合酶 (*gs*) 可催化谷氨酸形成谷氨酰胺, 进而调节机体

蛋白质代谢。

1 材料与方法

1.1 实验设计

以玉米淀粉作为糖源, 添加酪蛋白、鱼粉和明胶作为蛋白源, 使用等比例鱼油和豆油作为脂肪源, 配制了基础日粮。然后, 在基础日粮中分别添加 0、20、40、80、160 与 320 mg/kg 的核黄素, 进而制得 6 组半纯合饲料, 饲料配方及其概略养分组组成见表 1。采用逐级扩大的法则将原料按照配方比例混合均匀, 使用双螺杆挤条机制成粒径为 1.00 mm 的饲料。将饲料充分晾干、破碎, 置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中以备后续使用。使用高效液相色谱法 (HPLC) 测得饲料中实际核黄素含量分别为 3.91、20.53、49.18、87.80、169.61 和 326.66 mg/kg。

1.2 实验虾与养殖管理

实验用虾于室内循环养殖系统中驯化 1 周后, 挑选平均体重为 0.68 g 的健康虾苗 1 200 尾, 随机分为 6 组 (每组 4 重复, 每重复 50 尾), 养殖 10 周。实验期间, 每桶放置仿真水草和 PVC 管, 水体溶解氧维持在 6 mg/L 以上, 氨氮浓度保持在 0.02 mg/L 以下, pH 值保持在 7.0~7.2, 温度维持在 $(28\pm 2)\text{ }^\circ\text{C}$ 。每日于 8:00、12:30 和 17:00 分别饱食投喂 1 次, 采食结束后, 吸出粪便和残饵, 每隔 2 天换 1/3 水以保持水质清新。

1.3 样品采集

实验结束后, 将日本沼虾饥饿处理 24 h。统计每桶尾数并称重, 每组随机选择 48 尾采样, 即每桶 12 尾虾 (混样: 4 尾/管), 使用 1 mL 无菌注射器吸取 0.3 mL 抗凝剂 (0.1 mol/L $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 、0.14 mol/L NaCl、10 mmol/L EDTA、26 mmol/L $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 和 30 mmol/L $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 从虾头胸甲部抽取 0.3 mL 的血淋巴, 混匀离心 10 min ($4\text{ }^\circ\text{C}$, 3 500 r/min), 分离上清液保存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱。随后快速采集虾的肝胰腺, 快速放入冻存管, 置于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存, 用于后续相关指标的测定。

1.4 生长性能统计

生长性能的计算公式:

$$\text{存活率 (SR, \%)} = N_t/N_0 \times 100\%$$

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

表 1 日粮配方及其概略养分含量

Tab. 1 Formulation and proximate composition of the experimental diets

原料 ingredients	核黄素添加水平 supplemented riboflavin levels					
	0 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg	80 mg/kg	160 mg/kg	320 mg/kg
酪蛋白 casein	24	24	24	24	24	24
鱼粉 fish meal	22	22	22	22	22	22
明胶 gelatin	6	6	6	6	6	6
鱼油 fish oil	4	4	4	4	4	4
豆油 soybean oil	2	2	2	2	2	2
玉米淀粉 corn starch	25	25	25	25	25	25
羧甲基纤维 carboxymethyl cellulose	3.15	3.15	3.15	3.15	3.15	3.15
磷酸二氢钙 microcrystalline cellulose	2	2	2	2	2	2
胆固醇 cholesterol	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
微晶纤维 microcrystalline cellulose	9.54	9.54	9.54	9.54	9.54	9.54
复合预混料 compound-premix ¹⁾	1	1	1	1	1	1
卵磷脂 lecithin	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
诱食剂 attractant	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
乙氧基喹啉 ethoxyquin	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
核黄素 riboflavin	0	20	40	80	160	320
概略养分(风干基础) proximate composition (air-dry basis)						
粗蛋白/% crude protein	38.74	39.63	38.97	39.39	39.17	39.39
粗灰分/% crude ash	7.49	7.61	7.04	7.45	7.08	7.41
粗脂肪/% crude lipid	8.29	8.68	8.16	8.73	8.15	8.34
总能/(MJ/kg) gross energy	20.19	20.73	20.32	20.83	20.59	20.68
水分/% moisture	6.55	7.03	6.77	6.74	6.71	6.99
核黄素/(mg/kg) riboflavin	3.91	20.53	49.18	87.8	169.61	326.66

注: 1)每千克预混料中包含下列矿物质(g/kg)和维生素(IU或mg/kg), CuSO₄·5H₂O 2 g, FeSO₄·7H₂O 25 g, ZnSO₄·7H₂O 22 g, MnSO₄·4H₂O 7 g, Na₂SeO₃ 0.04 g, KI 0.026 g, CoCl₂·6H₂O 0.1 g, 维生素K₃ 220 mg, 吡哆醇 500 mg, 钴胺素1.6 mg, 维生素C 10 000 mg, 泛酸 1 000 mg, 硫胺素320 mg, 维生素B₉ 165 mg, 胆碱 60 000 mg, 维生素A 900 000 IU, 维生素H 100 mg, 维生素D 200 000 IU, 肌醇 15 000 mg, 维生素E 4 500 mg, 维生素B₅ 2 000 mg。

Notes: 1) premix supplied the following minerals (g/kg) and vitamins (IU or mg/kg), CuSO₄·5H₂O 2 g, FeSO₄·7H₂O 25 g, ZnSO₄·7H₂O 22 g, MnSO₄·4H₂O 7 g, Na₂SeO₃ 0.04 g, KI 0.026 g, CoCl₂·6H₂O 0.1 g, VK₃ 220 mg, pyridoxine 500 mg, cobalamin 1.6 mg, VC 10 000 mg, pantothenate 1 000 mg, thiamine 320 mg, VB₉ 165 mg, choline 60 000 mg, VA 900 000 IU, VH 100 mg, VD 200 000 IU, myoinositol 15 000 mg; VE 4 500 mg, VB₅ 2 000 mg.

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

饵料系数 (FC) = $F / (W_t - W_0)$

蛋白质效率 (PER, %) = $(W_t - W_0) / (F \times CP) \times 100\%$

式中, N_t 为实验末期虾的尾数, N_0 为实验初期虾的尾数; W_t 为实验末期虾的总重 (g), W_0 为实验初期虾的总重 (g); t 为饲养的天数 (d); F 为采食量 (g); CP 为饲料中粗蛋白含量 (%)。

1.5 指标测定

参考 AOAC 的方法, 对实验所用饲料进行概略养分含量测定^[22]: 将饲料称重, 放入干燥整洁的玻璃培养皿, 置于 105 °C 的烘箱烘至恒重, 测定饲料的水分含量。使用全自动凯式定氮仪 (FOSS KT260, 瑞士) 测定饲料中的粗蛋白水平。

使用索式抽提法测定饲料中的粗脂肪水平。将饲料置于电炉炭化至无烟, 使用马弗炉 (550 °C) 灼烧 5 h, 冷却后计算粗灰分含量。使用氧弹式测热仪 (PARR 128 I, 美国) 检测饲料总能。

采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定饲料和实验虾肝胰腺中的核黄素含量: 称取 0.25~0.50 g 饲料或者肝胰腺样品, 加入 70 mL 提取液 (25.0 mg EDTA+12.5 mL 冰乙酸+2.5 mL 三乙胺+460.0 mL 去离子水), 于 100 °C 水中煮沸 30~40 min, 摇动防止结块。冷却后, 加入提取液定容至 100 mL, 使用 0.45 μm 滤膜过滤后, 采用高效液相色谱仪检测分析。色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为磷酸二氢钠, 流动相 B 为甲醇, 以 1.0 mL/min 梯度淋洗。使用荧光检测

器检测样品, 激发波长为 440 nm, 发射波长为 525 nm; 柱温为室温, 进样体积为 10 μ L。

血淋巴葡萄糖浓度采用葡萄糖氧化酶法进行检测, 具体参考 Asadi 等^[23]。血淋巴丙酮酸含量采用 Nigam^[24]介绍的方法进行测量。血淋巴甘油三酯和血浆总胆固醇含量均参考 McNamara 等^[25]描述的方法测定。血淋巴总蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定, 具体参见 Okutucu 等^[26]。血淋巴尿素氮含量采用二乙酰肼比色法测定, 具体参考 Marsh 等^[27]。肝胰腺 D-AAO 活性参考 Woodward^[28]

描述的方法进行测定。

采用 Trizol 法提取日本沼虾肝胰腺中的总 RNA, 并使 RNA 浓度保持一致 (500 ng/mL)。随即将 RNA 反转录成稳定的 cDNA 以利于保存。在 GenBank 数据库中查找序列, 设计所需基因及内参 β -actin 的引物序列^[29], 并交由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行合成, 相关引物序列详见表 2。采用 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行荧光实时定量 PCR。在 96 孔板中加入 cDNA 模板 2 μ L, 正、反引物各 0.4 μ L,

表 2 荧光定量 PCR 引物序列

Tab. 2 Nucleotide sequences of the primers used by Real-time PCR

目的基因 target genes		引物序列(5'-3') primer sequences	序列号或参考文献 accession numbers or references
<i>glut2</i>	forward	CTGACTGTGCCGTCGTACAT	CP062040.1
	reverse	ACACATAGGCCACAGGTTG	
<i>hk</i>	forward	CATGGACAGCAGGATCTAC	KT932419
	reverse	AAACTGAACGTGAAGCCTAA	
<i>pk</i>	forward	TAAGGGACCTGAAATTCGTA	KP690140
	reverse	CCATCATCAACAAAAATCCT	
<i>pepck</i>	forward	GGCATGGCGTAATGGTAGGA	JX435469.1
	reverse	ACCTTACCCTTGTGTTCCGC	
<i>pyc</i>	forward	CACCATTTGTAGCACACAAC	KP690141
	reverse	AACTCCATTTGCACCTCTAA	
<i>g6p</i>	forward	CGTGGACCTTTCTTCATTAG	KP690144
	reverse	ACCATCAACCATTTGAGAAG	
<i>gs</i>	forward	TTGAACCTTCGCGACCATGA	KP690145.1
	reverse	CTGGCCTGGAGTGGCAATAA	
<i>fas</i>	forward	CGTTCATGCTCGCGCAAATA	MK307767.1
	reverse	CGCCACCTTAGTTCAGTT	
<i>acc</i>	forward	CAAGGTCCACTACATGGTCT	KP690138
	reverse	ACTCTTCCAAACTCTCTCC	
<i>hsl</i>	forward	GAAGCCAGCGCTAATTCG	MK633965.1
	reverse	TCGAACCACCCATGAGAAGC	
<i>cpt I</i>	forward	AATTTTTGACTGGCTTCTCC	KP690136
	reverse	TCCATTCTGGAAATCATCTG	
<i>gdh-β</i>	forward	CTTCCAGGATCGCATTCT	[30]
	reverse	AAGCAGCAGTACGGAGATCAA	
<i>gs</i>	forward	GGCATGGAGCAGGAGTA	[31]
	reverse	CGCCGAGTAGTAGGGT	
<i>β-actin</i>	forward	GTGCCATCTACGAGGGTTA	FL589653.1
	reverse	CGTCAGGGAGCTCGTAAGAC	

注: *glut2*. 葡萄糖转运蛋白2, *hk*. 己糖激酶, *pk*. 丙酮酸激酶, *pepck*. 磷酸烯醇丙酮酸羧激酶, *pyc*. 丙酮酸羧化酶, *g6p*. 葡萄糖-6-磷酸酶, *gs*. 糖原合酶, *fas*. 脂肪酸合成酶, *acc*. 乙酰CoA羧化酶, *hsl*. 激素敏感性脂肪酶, *cpt I*. 肉碱棕榈酰基转移酶 I, *gdh- β* . 谷氨酸脱氢酶, *gs*. 谷氨酰胺合酶。

Notes: *glut2*. glucose transporter 2, *hk*. hexokinase, *pk*. pyruvate kinase, *pepck*. phosphoenolpyruvate carboxykinase, *pyc*. pyruvate carboxylase, *g6p*. glucose-6-phosphatase, *gs*. glycogen synthase, *fas*. fatty acid synthase, *acc*. acetyl-CoA carboxylase, *hsl*. hormone-sensitive triglyceride lipase, *cpt I*. carnitine palmitoyltransferase I, *gdh- β* . glutamate dehydrogenase, *gs*. glutamine synthetase.

双蒸水 7.2 μL, SYBR[®] premix Ex Taq[™] 10 μL, 即反应总体积为 20 μL。设定程序: 95 °C 预变性 30 s; 随后进行 40 次循环: 95 °C 5 s, 60 °C 30 s; 熔解曲线: 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。样品扩增完成后, 使用 2^{-ΔΔC_t} 算法, 对目的基因的表达量进行计算, 最终得出相对表达量。

1.6 数据分析

运用 SPSS 26.0 软件对数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 通过 Levene 氏 Test 检验方差的齐性, 并采用 Turkey 氏检验进行多重比较。同时, 采用正交多项式对数据差异显著性类型进行分析。所得结果以平均值±标准误 (mean±SE) 的形式表达, 将 $P<0.05$ 设定为显著水平。此外, 通过回归模型及折线模型分析得出日本沼虾对核黄素的最适需求量^[32]。

2 结果

2.1 不同核黄素水平对日本沼虾生长性能的影响

当核黄素添加量达到 169.61 mg/kg 时, 日本沼虾的终末体重、WGR、SGR 和 PER 均呈现显著的二次和三次增长 ($P<0.05$)。采食量呈现显著的线性、二次和三次降低 ($P<0.05$), 且 169.61 mg/kg 组存活率显著低于其他各组 ($P<0.05$) (表 3)。以增重率建立二次曲线回归模型, 得出日本沼虾的最适核黄素需求量为 165.25 mg/kg (图 1)。

2.2 不同核黄素水平对日本沼虾血淋巴生化指标的影响

各组血淋巴葡萄糖、总胆固醇、甘油三酯和总蛋白含量均无显著差异 ($P>0.05$)。血淋巴丙酮酸的含量随核黄素剂量的上升呈显著线性和二次效应 ($P<0.05$), 而血淋巴尿素氮含量随核黄素水平的增加呈极显著的线性、二次和三次降低 ($P<0.001$) (表 4)。

2.3 不同核黄素水平对日本沼虾肝胰腺核黄素沉积量及 D-AAO 活性的影响

日粮核黄素水平显著影响肝胰腺 D-AAO 活性 ($P<0.05$)。当核黄素含量由 3.91 增长到 169.61 mg/kg 时, 肝胰腺核黄素沉积量呈现显著的线性、二次和三次增长 ($P<0.001$) (表 5)。随核黄素含量的增加呈降低趋势。通过对肝胰腺核黄素沉积量与饲料中核黄素水平的折线回归分析, 得出日本沼虾的最适核黄素需求量为 180.31 mg/kg (图 2)。

2.4 不同核黄素水平对日本沼虾肝胰腺代谢相关基因表达的影响

各组间 *gs*、*pepck* 与 *g6p* 表达量无显著差异 ($P>0.05$), 而 169.61 mg/kg 核黄素组的 *glut2*、*hk* 与 *pk* 的表达量显著高于缺乏组和过量组 ($P<0.05$)。此外, 169.61 mg/kg 核黄素组的 *pyc* 的表达量显著低于其他各组 ($P<0.05$) (图 3)。

fas 和 *acc* 表达量在 169.91 mg/kg 组达到谷值

表 3 日粮核黄素水平对日本沼虾生长性能及饲料利用率的影响

Tab. 3 Effects of different dietary riboflavin levels on the growth performance and feed utilization of *M. nipponense*

饲料核黄素水平 dietary riboflavin levels	初始体重/g initial body weight	终末体重/g final body weight	存活率/% SR	增重率/% WGR	特定生长率/(%/d) SGR	采食量/g FI	饵料系数 FC	蛋白质效率/% PER
3.91 mg/kg	0.68±0.01	1.37±0.02 ^{ab}	40.50±1.89 ^a	102.77±2.17 ^{ab}	1.01±0.02 ^{ab}	2.25±0.04 ^a	3.25±0.07 ^a	0.80±0.02 ^c
20.53 mg/kg	0.68±0.01	1.38±0.01 ^{ab}	41.50±0.50 ^a	103.86±2.37 ^{ab}	1.02±0.02 ^{ab}	2.18±0.03 ^{ab}	3.10±0.02 ^{abc}	0.81±0.01 ^{bc}
49.18 mg/kg	0.67±0.01	1.39±0.02 ^{ab}	38.50±1.26 ^{ab}	106.45±1.70 ^{ab}	1.04±0.01 ^{ab}	2.10±0.02 ^{bc}	2.94±0.04 ^{bc}	0.87±0.01 ^b
87.80 mg/kg	0.67±0.01	1.40±0.01 ^{ab}	42.00±0.82 ^a	108.16±3.67 ^{ab}	1.05±0.02 ^{ab}	2.11±0.01 ^{bc}	2.91±0.08 ^c	0.88±0.03 ^b
169.61 mg/kg	0.68±0.01	1.44±0.01 ^a	34.00±1.15 ^b	112.84±3.03 ^a	1.08±0.02 ^a	2.02±0.03 ^c	2.65±0.05 ^d	0.96±0.02 ^a
326.66 mg/kg	0.68±0.01	1.33±0.02 ^b	38.00±1.41 ^{ab}	98.47±4.06 ^b	0.98±0.03 ^b	2.09±0.04 ^{bc}	3.17±0.05 ^{ab}	0.80±0.01 ^{bc}
多项式对比 polynomial contrasts								
线性 linear	ns	ns	*	ns	ns	***	*	ns
二次 quadratic	ns	*	ns	*	*	***	***	**
三次 cubic	ns	*	ns	*	*	***	*	***

注: 同列数据肩标上标注不同字母表明各组间存在显著差异 ($P<0.05$)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns 差异不显著, 下同。

Notes: Data in the same column with different letters manifest remarkable difference ($P<0.05$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns means no difference, the same below.

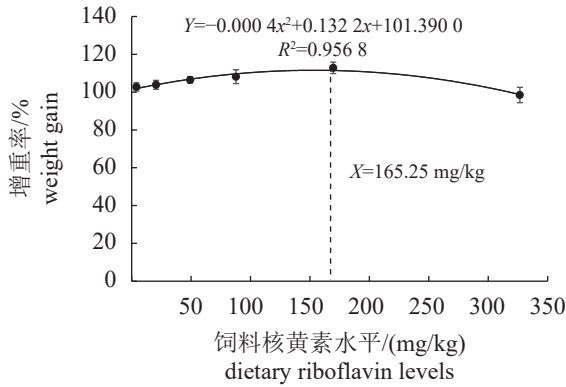


图 1 日本沼虾增重率与日粮核黄素水平的关系

Fig. 1 Relationships between dietary riboflavin level and weight gain of *M. nipponense*

($P < 0.05$)。169.91 mg/kg 组的 *hsl* 表达量显著高于缺乏组和过量组 ($P < 0.05$), 而各组间 *cpt I* 表达差异不显著 ($P > 0.05$) (图 4)。 *gdh* 和 *gs* 的表达量在核黄素水平为 169.91 mg/kg 时达到峰值 ($P < 0.05$) (图 5)。

3 讨论

3.1 不同水平核黄素对日本沼虾生长性能的影响

本研究中日本沼虾的成活率与生长率偏低, 究其原因可能是本次养殖实验于室内循环系统进行, 养殖环境和水质条件与日本沼虾的自然生长环境均有较大差别^[33]。此外, 本研究中日本沼虾放养密度稍高, 出现应激反应和攻击同类的现象, 导致死亡率较高^[34]。研究表明, 水产动物缺乏核黄素会导致皮炎、畏光、白内障与表皮突起等缺乏症。本实验中, 对照组日本沼虾并未出现这些典型的核黄素缺乏症, 分析原因可能是物种及养殖周期长短不同所致^[5]。但是, 不同水平的核黄素显著影响日本沼虾的生长性能。当日粮核黄素水平为 169.61 mg/kg, 终末体重、增重率、特定

表 4 日粮核黄素水平对日本沼虾血淋巴生化指标的影响

Tab. 4 Effects of different dietary riboflavin levels on the hemolymph biochemical indexes of *M. nipponense*

饲料核黄素水平 dietary riboflavin levels	葡萄糖/(mmol/L) glucose	丙酮酸/(μmol/mL) pyruvate	甘油三酯/(mmol/L) TG	总胆固醇/(mmol/L) T-CHO	总蛋白/(g/L) TP	尿素氮/(mmol/L) BUN	
3.91 mg/kg	3.27±0.15	0.084±0.005 ^b	0.088±0.011	0.040±0.004	4.05±0.59 ^{ab}	0.60±0.031 ^a	
20.53 mg/kg	3.88±0.08	0.127±0.018 ^a	0.070±0.009	0.028±0.005	3.15±0.29 ^b	0.54±0.037 ^{ab}	
49.18 mg/kg	3.61±0.39	0.023±0.002 ^c	0.090±0.004	0.038±0.006	5.36±0.67 ^a	0.38±0.025 ^{bc}	
87.80 mg/kg	3.71±0.45	0.051±0.003 ^{bc}	0.095±0.012	0.035±0.005	4.83±0.39 ^{ab}	0.37±0.036 ^{bc}	
169.61 mg/kg	3.97±0.26	0.069±0.005 ^b	0.070±0.004	0.030±0.004	3.65±0.14 ^{ab}	0.37±0.041 ^{bc}	
326.66 mg/kg	3.67±0.38	0.029±0.002 ^c	0.060±0.011	0.033±0.005	5.10±0.45 ^{ab}	0.35±0.060 ^c	
多项式对比 polynomial contrasts	线性 linear	ns	**	ns	ns	ns	***
	二次 quadratic	ns	*	ns	ns	ns	***
	三次 cubic	ns	ns	ns	ns	ns	***

表 5 日粮核黄素水平对日本沼虾肝胰腺核黄素沉积量及 D-AAO 活性的影响

Tab. 5 Effects of different dietary riboflavin levels on the riboflavin deposition and D-AAO activity in the hepatopancreas of *M. nipponense*

饲料核黄素水平 dietary riboflavin levels	肝胰腺核黄素含量/(mg/kg) riboflavin content	肝胰腺 D-AAO 活性/(U/mg protein) D-AAO activity
3.91 mg/kg	7.86±0.06 ^d	24.89±0.69 ^d
20.53 mg/kg	7.67±0.03 ^d	33.52±0.31 ^a
49.18 mg/kg	8.84±0.08 ^c	20.03±0.31 ^c
87.80 mg/kg	8.79±0.05 ^c	30.44±0.34 ^b
169.61 mg/kg	11.82±0.10 ^a	27.35±0.63 ^c
326.66 mg/kg	10.81±0.10 ^b	26.22±0.59 ^{cd}
多项式对比 polynomial contrasts	线性 linear	***
	二次 quadratic	***
	三次 cubic	***

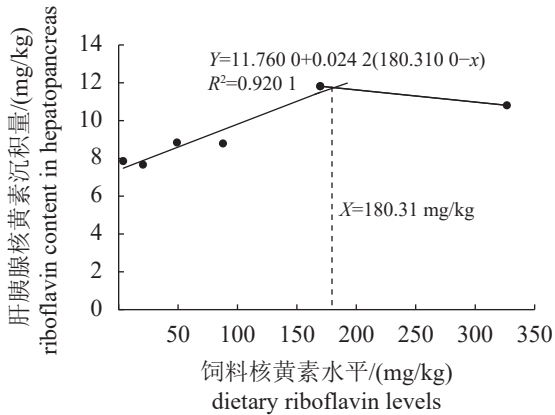


图2 日本沼虾肝胰腺核黄素含量与日粮核黄素水平的关系

Fig. 2 Relationships between different dietary riboflavin levels and hepatopancreas riboflavin content of *M. nipponense*

生长率和蛋白质效率均达到峰值, 而饵料系数最低。这表明, 饲料中添加适宜水平的核黄素可以显著促进日本沼虾的生长发育, 并提高饲料利用率。究其原因, 可能是因为核黄素在机体内以FAD和FMN的形式参与多种的代谢过程, 进而改善了动物的生长发育及代谢机能^[35]。然而, 过量的核黄素会显著抑制日本沼虾的生长, 这与斑点叉尾鲷^[36]和杂交条纹鲈 [*Morone chrysops* (♀) × *M. saxatilis* (♂)]^[37]的研究结果相类似。以增重率为评价指标建立曲线回归模型, 得出日本沼虾的适宜核黄素需求量为165.25 mg/kg, 这与凡纳滨对虾的需求量(160 mg/kg)^[10]相近, 但高于草鱼(5 mg/kg)^[38]和斑点叉尾鲷(6 mg/kg)^[36]等的需求量。究其原因, 可能在于虾类的采食时间比鱼类长, 导致核黄素在水中的溶失量较高^[39], 故甲壳类动物对核黄素的需求量高于鱼类。另外, 水产动物种类、食性、规格及养殖周期等的不同也会对核黄素的需求量造成较大影响^[40]。

除生长性能外, 组织核黄素沉积量也是衡量虾类核黄素需求量的一个重要指标^[7]。本实验中, 随着饲料核黄素含量的升高, 日本沼虾肝胰腺核黄素的含量呈现先上升后下降的趋势。这表明, 日粮中适宜的核黄素含量能够增加日本沼虾体内的核黄素沉积量, 进而发挥其生理调控作用。以肝胰腺核黄素含量为评价指标进行折线回归分析, 得出日本沼虾的适宜核黄素需求量为180.31 mg/kg。该实验结果与中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)

的需求量(100~200 mg/kg)^[41]相近, 但是高于以增重率为评价指标所得出的结果。这表明, 与维持正常的生长发育相比, 日本沼虾需要消耗更多的核黄素来维持体内某些特殊的生理功能^[42]。此外, *D*-AAO活性也被认为是确定水生动物核黄素需求量的重要指标^[43]。本实验中, 不同处理组*D*-AAO的活性差异显著, 但是相较于生长指标和肝胰腺核黄素沉积量, 其并没有呈现规律性变化, 具体原因还需进一步研究, 因此本实验不以*D*-AAO活性作为评价指标。

3.2 不同核黄素水平对日本沼虾血淋巴生化指标的影响

动物机体内营养物质的流通和代谢主要依靠血液进行运输, 血淋巴生化指标能够在一定程度上反映甲壳类动物机体的代谢情况。本研究中, 各组间血淋巴丙酮酸含量随日粮核黄素水平的升高而先升高后降低。究其原因, 在于适宜的核黄素水平能够提高丙酮酸激酶的活性, 促进糖酵解途径, 继而产生大量的丙酮酸^[44]。血淋巴甘油三酯和总胆固醇含量无明显差异, 但是总胆固醇含量随日粮核黄素水平的增加呈现先下降后上升的趋势, 表明适宜核黄素具有降低血淋巴甘油三酯和总胆固醇含量的作用。究其原因, 在于核黄素可以促进肠道的生长发育, 进而提高脂肪代谢酶的活性, 最终改善机体对营养物质的消化利用^[45]。另外, 血淋巴尿素氮的含量随着日粮核黄素水平的增加显著下降, 表明适宜核黄素能够促进虾体蛋白质合成。究其原因, 在于适宜核黄素含量可促进机体内蛋白合成, 并抑制蛋白质的分解^[46]。

3.3 不同核黄素水平对日本沼虾代谢机能的影响

本研究中, 适宜的核黄素水平显著上调 *glut2*、*hk* 和 *pk* 的表达量, 且其均在 169.61 mg/kg 组达到峰值, 说明饲料中补充适宜的核黄素能够促进虾体的丙酮酸代谢。究其原因, FAD 作为丙酮酸脱氢酶复合体的辅酶, 参与了丙酮酸氧化脱羧过程, 这个过程连接了两个重要反应(即糖酵解和柠檬酸循环), 从而进行反馈调节, 上调了 *glut2*、*hk* 和 *pk* 的转录水平^[47]。此外, 饲料中添加适宜水平核黄素显著降低了 *pyc* 的表达量, 表明机体糖异生途径得到抑制。推测原因, 可能在于糖酵解产生的 ATP 足够维持机体的正常生长, 从而减缓了糖

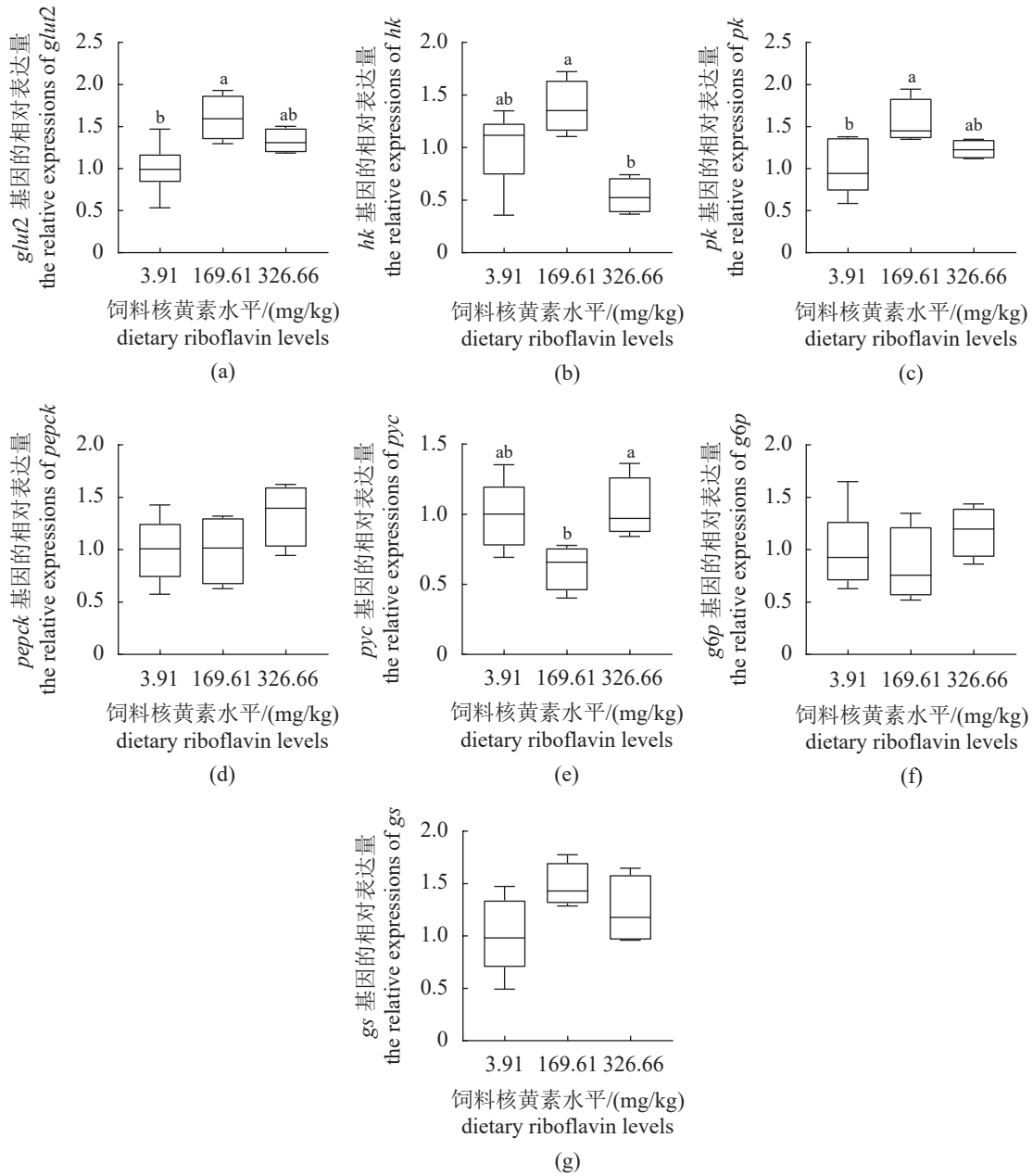


图3 日粮核黄素水平对日本沼虾肝胰腺中糖代谢相关基因表达水平的影响

盒子的上线和下线代表第一和第三四分位数, 中间的线代表中位数, 上线代表最大值, 下线代表最小值。柱子下方不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Fig. 3 Effects of different riboflavin levels on the mRNA expressions of glycometabolism-related genes in the hepatopancreas of *M. nipponense*

The upper and lower limits of the box represent the first and third quartiles. The horizontal line inside the box represents the second quartile (median). Whiskers represent the maximum and minimum values. Bars with different lower-case letters indicate significant difference ($P < 0.05$), the same below.

异生的强度, 最终使虾体葡萄糖稳态维持在正常水平^[48]。本研究中, 适宜的核黄素水平显著下调 *fas* 和 *acc* 的 mRNA 表达量。究其原因, 可能是由于核黄素具有防止脂质过氧化的作用, 其可能通过抑制 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶表达和降低内质网应激, 减少脂肪酸的合成^[11]。此外,

FAD 作为脂酰 CoA 脱氢酶的辅基, 参与脂酰 CoA 的脱氢反应, 从而进行反馈调节, 上调了 *hsl* 表达, 进而促进脂肪酸的 β -氧化^[49]。本实验中, 随着日粮核黄素水平的增加, *gdh* 和 *gs* 的表达量均呈现先升高后降低的趋势, 表明适宜的核黄素水平能显著促进虾体 *gdh* 的蛋白质合成^[50]。

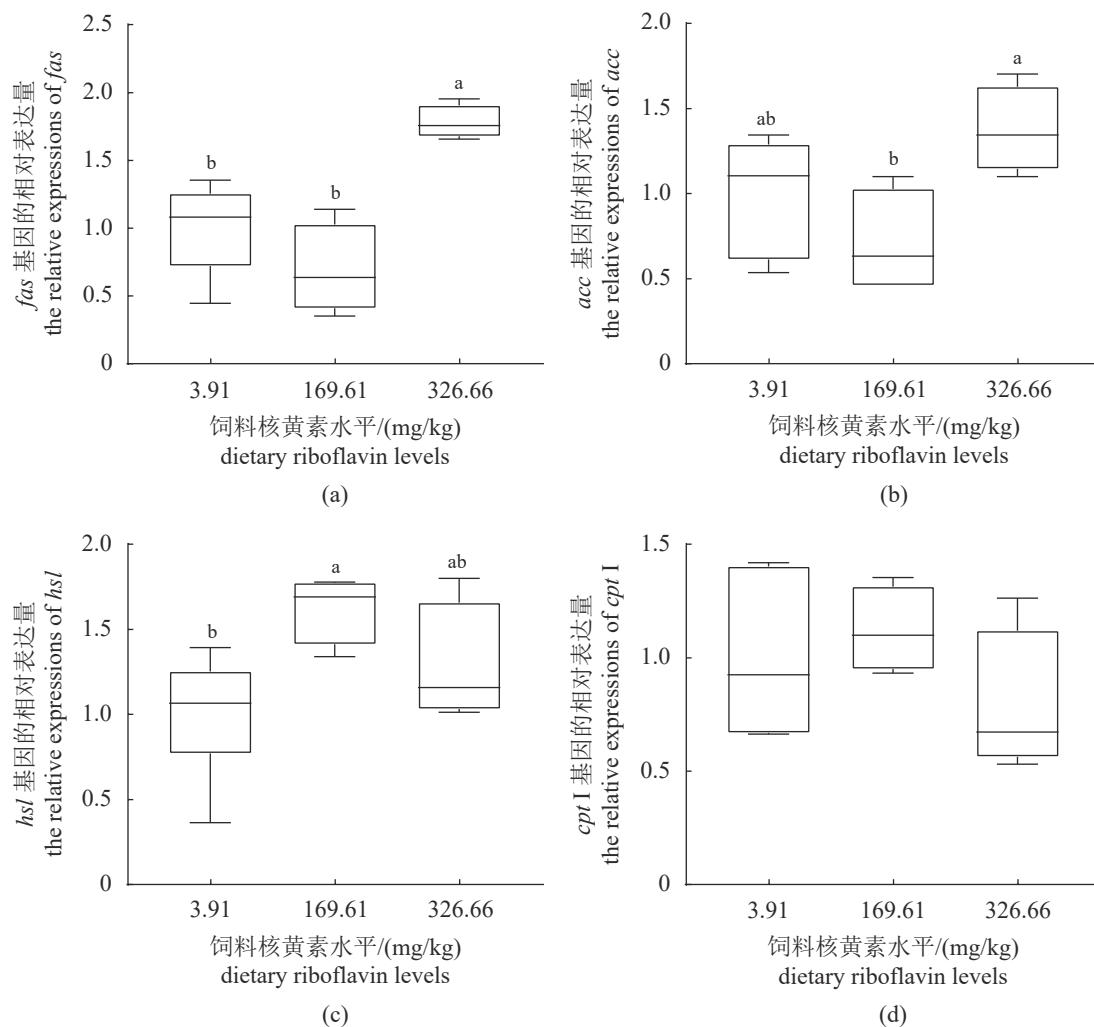


图 4 日粮核黄素水平对日本沼虾肝胰腺脂代谢相关基因表达水平的影响

Fig. 4 Effects of different riboflavin levels on the mRNA expression of lipid metabolism-related genes in the hepatopancreas of *M. nipponense*

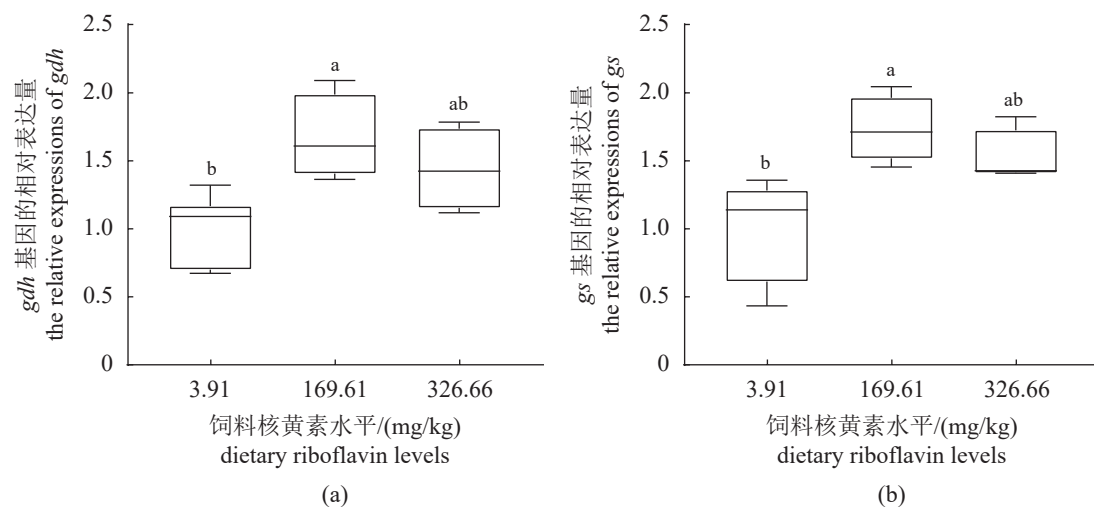


图 5 日粮核黄素水平对日本沼虾肝胰腺蛋白质代谢相关基因表达水平的影响

Fig. 5 Effects of different riboflavin levels on the mRNA expressions of protein metabolism-related genes in the hepatopancreas of *M. nipponense*

4 结论

综上所述, 在日粮中添加适宜剂量的核黄素, 能够改善日本沼虾的生长性能和饲料利用率, 并上调糖酵解、脂肪酸 β -氧化和蛋白质合成等途径。以增重率和肝胰腺核黄素含量为评价指标, 进行回归模型进行分析, 得出日本沼虾适宜核黄素需求量为 165.25~180.31 mg/kg。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Saedisomeolia A, Ashoori M. Riboflavin in human health: a review of current evidences[J]. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2018, 83: 57-81.
- [2] National Research Council. Nutrient requirements of fish and shrimp[M]. National Academies Press, 2011.
- [3] 李爱杰. 水产动物营养与饲料学[M]. 中国农业出版社, 1996.
Li A J. Aquatic animal nutrition and feed science[M]. China Agriculture Press, 1996 (in Chinese).
- [4] 朱伟, 麦康森. 水产动物 B 族维生素营养研究方法进展[J]. 水产学报, 2001, 25(4): 373-378.
Zhu W, Mai C S. Advances in methods of vitamin Bs nutrition studies on aquatic animals[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, 25(4): 373-378 (in Chinese).
- [5] Chen H Y, Hwang G. Estimation of the dietary riboflavin required to maximize tissue riboflavin concentration in juvenile shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. *The Journal of Nutrition*, 1992, 122(12): 2474-2478.
- [6] 姜建湖, 陈建明, 沈斌乾, 等. 草鱼幼鱼对饲料中核黄素的需要量[J]. 动物营养学报, 2016, 28(09): 2771-2777.
Jiang J H, Chen J M, Shen B Q, et al. Dietary riboflavin requirement of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(09): 2771-2777 (in Chinese).
- [7] 王玥, 李二超, 孙新瑾, 等. 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 幼蟹对饲料中维生素 B₂ 的适宜需求量[J]. 饲料工业, 2010, 31(12): 13-16.
Wang Y, Li E C, Sun X J, et al. The optimal requirement for vitamin B₂ in feed for juvenile juvenile eriocheir sinensis (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Feed Industry*, 2010, 31(12): 13-16 (in Chinese).
- [8] 王菲, 李向飞, 李鹏飞, 等. 饲料维生素 B₂ 水平对团头鲂幼鱼生长性能, 体组成, 抗氧化功能和肠道酶活性的影响[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(5): 319-324.
Wang F, Li X F, Li P F, et al. Effects of dietary vitamin B₂ level on growth performance, body composition, antioxidant function and intestinal enzyme activity of juvenile *Megalobrama amblycephala*[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2016, 44(5): 319-324 (in Chinese).
- [9] Murai T, Andrews J W. Riboflavin requirement of channel catfish fingerlings[J]. *The Journal of Nutrition*, 1978, 108(9): 1512-1517.
- [10] 王军霞, 翟宗昭, 王维娜, 等. 凡纳滨对虾对维生素 B₂, B₆ 的营养需求研究 [C]//中国动物学会. 北方七省市动物学会学术研讨会论文集. 太原: 中国动物学会, 2005.
Wang J X, Zhai Z Z, Wang W N, et al. Requirements for riboflavin and pyridoxine in the prawn *Litopenaeus vannamei*[C]//the Zoological Society of China. Proceedings of the Symposium of Zoological Societies of the Seven Northern Provinces. Taiyuan: Cities of the Zoological Society of China, 2005 (in Chinese).
- [11] 辛中豪, 高蔚娜, 郭长江. 核黄素对脂质代谢影响研究进展[J]. 解放军预防医学杂志, 2016, 34(2): 281-283.
Xin Z H, Gao W N, Guo C J. Research progress on the effect of riboflavin on lipid metabolism[J]. *Journal of Preventive Medicine of Chinese People's Liberation Army*, 2016, 34(2): 281-283 (in Chinese).
- [12] Manthey K C, Rodriguez-Melendez R, Hoi J T, et al. Riboflavin deficiency causes protein and DNA damage in HepG2 cells, triggering arrest in G1 phase of the cell cycle[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2006, 17(4): 250-256.
- [13] Fu H T, Jiang S F, Xiong Y W. Current status and prospects of farming the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in China[J]. *Aquaculture Research*, 2012, 43(7): 993-998.
- [14] Gui J F, Tang Q, Li Z, et al. Aquaculture in China: success stories and modern trends[M]. John Wiley & Sons, 2018.
- [15] Sun M, Li X F, Ge Y P, et al. Dietary thiamine requirement and its effects on glycolipid metabolism in oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*)[J]. *Aquaculture*, 2022, 550: 737824.
- [16] 蒋青, 刘波, 黄志斌. 青虾的营养与投喂[J]. 科学养鱼, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 2020(9): 84.
- Jiang Q, Liu B, Huang Z B. Nutrition and feeding of freshwater shrimp[J]. *Scientific Fish Farming*, 2020(9): 84 (in Chinese).
- [17] Li Y, Huang Y, Zhang M, *et al.* Effect of dietary vitamin E on growth, immunity and regulation of hepatopancreas nutrition in male oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*[J]. *Aquaculture Research*, 2019, 50(7): 1741-1751.
- [18] Liu M Y, Sun M, Zhang L, *et al.* The essentiality of dietary myo-inositol to oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*): evidence in growth performance, lipid metabolism and mitochondrial function[J]. *Aquaculture*, 2023, 567: 739304.
- [19] 徐杰. 饵料中添加维生素 D 对日本沼虾生长的影响[D]. 保定: 河北大学, 2001.
- Xu J. The effect of vitamin D in diet on the growth of *Macrobrachium nipponense*[D]. Baoding: Hebei University, 2001 (in Chinese).
- [20] Wang J W, Che Y C, Sun M, *et al.* Optimal niacin requirement of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* as determined by growth, energy sensing, and glycolipid metabolism[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2022. DOI: 10.1155/2022/8596427.
- [21] Enes P, Panserat S, Kaushik S, *et al.* Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2009, 35: 519-539.
- [22] AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official methods of analysis[M]. 15th ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists, 1990.
- [23] Asadi F, Hallajian A, Asadian P, *et al.* Serum lipid, free fatty acid, and proteins in juvenile sturgeons: *Acipenser persicus* and *Acipenser stellatus*[J]. *Comparative Clinical Pathology*, 2009, 18(3): 287-289.
- [24] Nigam V N. An enzymatic method for the determination of pyruvate phosphoenolpyruvate, 2-and-3-phosphoglyceric acids[J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1962, 40(6): 836-840.
- [25] McNamara J R, Schaefer E J. Automated enzymatic standardized lipid analyses for plasma and lipoprotein fractions[J]. *Clinica Chimica Acta*, 1987, 166(1): 1-8.
- [26] Okutucu B, Dinçer A, Habib Ö, *et al.* Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2007, 70(5): 709-711.
- [27] Marsh W H, Fingerhut B, Miller H. Automated and manual direct methods for the determination of blood urea[J]. *Clinical Chemistry*, 1965, 11(6): 624-627.
- [28] Woodward B. Riboflavin requirement for growth, tissue saturation and maximal flavin-dependent enzyme activity in young rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at two temperatures[J]. *The Journal of Nutrition*, 1985, 115(1): 78-84.
- [29] Luo N, Ding Z L, Kong Y Q, *et al.* An evaluation of increasing linolenic acid level in the diet of *Macrobrachium nipponense*: lipid deposition, fatty acid composition and expression of lipid metabolism-related genes[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2018, 24(2): 758-767.
- [30] Li E, Arena L, Chen L, *et al.* Characterization and tissue-specific expression of the two glutamate dehydrogenase cDNAs in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Crustacean Biology*, 2009, 29(3): 379-386.
- [31] Liu H Y, Sun W W, Dong X H, *et al.* Profiling of up-regulated genes response to acute hypo-osmotic stress in hepatopancreas and gill of the Pacific white shrimps (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Int. J. Biol.*, 2016, 8: 43-57.
- [32] Robbins K R, Norton H W, Baker D H. Estimation of nutrient requirements from growth data[J]. *The Journal of Nutrition*, 1979, 109(10): 1710-4.
- [33] 王孝杉, 张晨捷, 彭士明等. 循环水和网箱两种养殖模式下黄姑鱼生长、免疫及血清生化的差异[J]. *海洋渔业*, 2018, 40(2): 207-216.
- Wang X S, Zhang C J, Peng S M, *et al.* Difference in growth, immunity and serum biochemical parameters of *Nibea albiflora* between closed recirculating aquaculture and offshore cage culture system[J]. *Marine Fisheries*, 2018, 40(2): 207-216 (in Chinese).
- [34] 顾秋明. 杂交青虾“太湖 1 号”健康养殖技术研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2013.
- Gu Q M. Studies on healthy aquaculture technology of hybrid oriental river prawn “Taihu No. 1”[D]. Suzhou: Soochow University, 2013 (in Chinese).
- [35] United States National Research Council. Nutrient requirements of fish and shrimp[M]. National Academies Press, 2011.
- [36] Serrini G, Zhang Z, Wilson R P. Dietary riboflavin requirement of fingerling channel catfish (*Ictalurus*

- punctatus*)[J]. *Aquaculture*, 1996, 139(3-4): 285-290.
- [37] Deng D F, Wilson R P. Dietary riboflavin requirement of juvenile sunshine bass (*Morone chrysops* ♀× *Morone saxatilis* ♂)[J]. *Aquaculture*, 2003, 218(1-4): 695-701.
- [38] Li W, Zhou X Q, Feng L, *et al.* Effect of dietary riboflavin on growth, feed utilization, body composition and intestinal enzyme activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2010, 16(2): 137-143.
- [39] Chen H Y, Wu F C, Tang S Y. Thiamin requirement of juvenile shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. *The Journal of Nutrition*, 1991, 121(12): 1984-1989.
- [40] Satoh S, Hernández A, Tokoro T, *et al.* Comparison of phosphorus retention efficiency between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a commercial diet and a low fish meal based diet[J]. *Aquaculture*, 2003, 224(1-4): 271-282.
- [41] 徐志昌, 刘铁斌, 李爱杰. 中国对虾对维生素 B₂, B₅, B₆ 营养需要的研究[J]. 水产学报, 1995, 19(2): 97-104.
- Xu Z C, Liu T B, Li A J. Studies on the requirement for riboflavin, nicotinamide and pyridoxine in the prawn *Penaeus chinensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1995, 19(2): 97-104 (in Chinese).
- [42] Jiang G Z, Wang M, Liu W B, *et al.* Dietary choline requirement for juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2013, 19(4): 499-505.
- [43] Woodward B. Sensitivity of hepatic D-amino acid oxidase and glutathione reductase to the riboflavin status of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*)[J]. *Aquaculture*, 1983, 34(3-4): 193-201.
- [44] 郭彪. 光照和温度波动对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 蜕皮和生长的影响及机制的初步研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- Guo B. The effects of light and temperature fluctuations on the molting, growth of *Litopenaeus vannamei* and its mechanisms[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010 (in Chinese).
- [45] Yu H R, Guo M J, Yu L Y, *et al.* Effects of dietary riboflavin supplementation on the growth performance, body composition and anti-oxidative capacity of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) post-smolts[J]. *Animals*, 2022, 12(22): 3218.
- [46] 吴莉芳, 周锴, 闫磊, 等. 发酵豆粕替代鱼粉对洛氏鳕血清主要生化指标, 蛋白酶活力及蛋白质代谢的影响 [J]. 吉林农业大学学报, 2020, 42(1): 90-95.
- Wu L F, Zhou K, Yan L, *et al.* Effects of fermented soybean meal replacement of fishmeal on main biochemical parameters, protease activity and protein metabolism of *Rhynchocypris lagowskii* Dybowski[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2020, 42(1): 90-95 (in Chinese).
- [47] Fernie A R, Carrari F, Sweetlove L J. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(3): 254-261.
- [48] Williamson J R, Kreisberg R A, Felts P W. Mechanism for the stimulation of gluconeogenesis by fatty acids in perfused rat liver[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1966, 56(1): 247-254.
- [49] Wang Y, Mohsen A W, Mihalik S J, *et al.* Evidence for physical association of mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative phosphorylation complexes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(39): 29834-29841.
- [50] Qiu L, Shi X, Yu S, *et al.* Changes of ammonia-metabolizing enzyme activity and gene expression of two strains in shrimp *Litopenaeus vannamei* under ammonia stress[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 211.

Effects of dietary riboflavin levels on the growth performance and metabolic function of *Macrobrachium nipponense*

QIAN Xiangyu¹, LI Xiangfei¹, ZHANG Ling¹, CHEN Weiliang¹, LIU Zishang¹,
SUN Cunxin², LIU Bo², LIU Wenbin^{1*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Nutrition and Feed Science of Jiangsu Province, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Science, Wuxi 214081, China)

Abstract: Riboflavin as an indispensable water-soluble B vitamin, is particularly crucial for the growth and metabolism of animals. It often participates in biochemical reactions as flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotides (FMN), and plays a key role in the normal growth and the development of animal body. To date, the research data on the appropriate vitamin requirements of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) are relatively lacking compared to other nutrients, which has slowed the process of research and development of formula feed, as well as hindered the efficient and economic development of aquaculture. Therefore, this experiment was conducted to investigate the effects of different dietary riboflavin levels on the growth performance and metabolic function of *M. nipponense*, in order to help the construction of the nutritional requirements database of this species, and facilitate the development of high quality formula feed. A total of 1 200 oriental river prawns with an average weight of 0.68 g were picked out, and randomly separated into 6 groups, with 4 replicates in each group, and 50 prawns in each tank, respectively. Six semi-purified diets were prepared, containing 3.91, 20.53, 49.18, 87.80, 169.61 and 326.66 mg/kg of riboflavin. Subsequently, a 10-week feeding trial was conducted in an indoor recirculation water system. The results showed that: ① the 169.61 mg/kg group had significantly higher final weight, weight gain rate, specific growth rate, protein retention rate, plasma pyruvate level, and hepatopancreatic riboflavin content compared with other groups, while the feed intake, feed conversion ratio, and plasma urea nitrogen levels were significantly lower than the other groups. Using the weight gain rate and hepatopancreatic riboflavin content as evaluation indicators to establish the regression models, it was indicated that the optimal riboflavin requirement of *M. nipponense* was 165.25-180.31 mg/kg; ② the mRNA levels of glucose transporter 2, hexokinase, pyruvate kinase, hormone sensitive lipase, glutamate dehydrogenase, and glutamine synthase all increased significantly with the increase of dietary riboflavin levels, and maximized in the 169.61 mg/kg group, then decreased; the mRNA levels of pyruvate carboxylase, fatty acid synthase, and acetyl CoA carboxylase all showed an opposite result, and minimized in the 169.61 mg/kg group. In summary, adding 165.25-180.31 mg/kg of riboflavin significantly promoted the growth performance and feed utilization of *M. nipponense*, and enhanced the glycolysis, fatty acids β -oxidation, and protein synthesis pathways. This study preliminarily clarified the molecular mechanism of riboflavin to improve the growth performance and metabolic function of *M. nipponense*, which can provide technical guidance for the construction of nutrition demand database of *M. nipponense* and the research and development of efficient formula feed.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; riboflavin; growth performance; metabolic function

Corresponding author: LIU Wenbin. E-mail: wbliu@njau.edu.cn

Funding projects: Jiangsu Agriculture Industry Technology System [JATS (2022) 514]; China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-48)