



海洋细菌 CAZymes 的研究进展

许俊杰, 蔡中华, 周进*

清华大学深圳国际研究生院, 海洋工程研究院, 广东 深圳 518055

许俊杰, 蔡中华, 周进. 海洋细菌 CAZymes 的研究进展. 微生物学报, 2022, 62(4): 1286–1307.

Xu Junjie, Cai Zhonghua, Zhou Jin. Research progress of carbohydrate-active enzymes on marine bacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1286–1307.

摘要: 多糖是大型藻类、浮游植物和微生物的主要成分, 多糖降解产物是海洋有机物的主要来源。碳水化合物活性酶(carbohydrate-active enzymes, CAZymes)是负责糖类化合物降解、修饰及生成糖苷键的功能酶系, 是糖类物质代谢通路中的基本功能单元。多数异养细菌都具备一套完善的碳水化合物活性酶编码系统, 它们是参与碳水化合物降解的主要驱动力。基于碳水化合物活性酶的种类多样性、结构复杂性和功能特异性, 我们对该家族的成员和作用机理还缺乏全局性了解。碳水化合物化学、分子生态学、微生物学和生物信息学的发展使人们对多糖的结构、细菌降解多糖的方式以及碳水化合物活性酶的作用机理有了新的认识。本次综述首先介绍了海洋环境中存在的多糖类别及相应的定性及定量分析方法; 其次, 总结了碳水化合物活性酶的新增成员以及数据库的现状, 讨论了多糖利用位点(polysaccharide utilization loci, PULs)及几种海洋多糖降解的分子机制; 最后, 提出了一个基于多糖结构复杂性与细菌驱动的降解方式新模型, 并对海洋细菌降解多糖与典型生态事件(如藻华)的关系进行了总结。论文旨在全局性地理解碳水化合物活性酶的分子功能与生态意义, 为深入认识海洋环境中的碳水化合物代谢提供帮助。

关键词: 海洋细菌; 碳水化合物活性酶; 多糖利用位点; 降解机制; 生态意义

基金项目: 国家自然科学基金(41976126); 广东省基础与应用基础研究(2020B1515120012); 深圳市科技创新委计划(RCJC20200714114433069, JCYJ20200109142818589, WDZC20200817153116001, JCYJ20200109142822787)

Supported by the National Nature Science Foundation of China (41976126), by the Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2020B1515120012) and by the Science and Technology Projects of Shenzhen Science and Technology Innovation Committee (RCJC20200714114433069, JCYJ20200109142818589, WDZC20200817153116001, JCYJ20200109142822787)

*Corresponding author. Tel: +86-755-86953413; E-mail: zhou.jin@sz.tsinghua.edu.cn

Received: 17 August 2021; Revised: 29 September 2021; Published online: 23 December 2021

Research progress of carbohydrate-active enzymes on marine bacteria

XU Junjie, CAI Zhonghua, ZHOU Jin*

Institute for Ocean Engineering, Tsinghua Shenzhen International Graduate School, Shenzhen 518055, Guangdong, China

Abstract: Polysaccharides are the main components of macroalgae, phytoplankton, and microorganisms. Polysaccharide degradation products are the main source of marine organic matter. Carbohydrate-active enzymes (CAZymes), the typical functional enzymes for the degradation, modification, and generation of glycosidic bonds of carbohydrate compounds, are the basic functional units in carbohydrate metabolic pathways. Most heterotrophic bacteria are endowed with a complete CAZymes-encoding system, which is the main driving force for carbohydrate metabolism. However, owing to the diversity, complex structures, and functional specificity of CAZymes, there is a lack of a systematic understanding of the members in this family and the molecular mechanisms of action. The development of carbohydrate chemistry, molecular ecology, microbiology, and bioinformatics allowed an in-depth understanding of the structures of polysaccharides, the degradation pathways, and the action mechanisms of the CAZymes. In this paper, the research advances of CAZymes were summarized. At first, this review introduced the types of polysaccharides in the marine environment and the corresponding methods of qualitative and quantitative analysis. Secondly, we summarized the latest progress of CAZymes and the database status and discussed polysaccharide utilization loci (PULs) and molecular degradation mechanisms of several marine polysaccharides. Finally, we presented a new conceptual model linking polysaccharide structural complexity to bacteria-driven polysaccharide utilization, and introduced the relationship between the polysaccharide degradation by heterotrophic bacteria and the algal bloom dynamics. The purpose of this paper is to enhance the systematic understanding of the molecular functions and ecological significance of CAZymes and deepen the understanding of carbohydrate metabolism in the marine environment.

Keywords: marine bacteria; carbohydrate-active enzymes; polysaccharide utilization loci; degradation mechanisms; ecological roles

全球约一半的净初级生产力由海藻贡献, 其中大部分被海洋细菌呼吸利用然后以 CO₂ 形式返回大气^[1]。海洋细菌是分解有机物的直接动力, 这是地球上规模最大, 速度最快的分解代谢与生物转化过程之一。相比于陆地环境, 海洋类似于“一个全球性的消化器”, 几乎所有从地表注入的多糖类有机物都被用于海洋细菌呼吸作用的底物, 进而转化为无机营养。通过

海洋细菌对多糖的利用将光合作用固定的碳返回大气层, 因而海洋细菌对大分子多糖的降解过程是碳循环的关键一环。

为了利用多糖作为底物, 细菌需要具有正确结构特异性的碳水化合物活性酶(carbohydrate-active enzymes, CAZymes)。截至 2020 年 5 月, CAZymes 包含了 167 个糖苷水解酶家族、40 个多糖裂解酶家族、17 个碳水化合物酯酶家族、

110 个糖基转移酶家族、16 个辅助酶家族, 以及 86 个碳水化合物结合模块。由于 CAZymes 是基于序列相似性和共同祖先进行分类的, 不管它们的底物特异性如何, 每个 CAZymes 家族都包括具有不同底物特异性的酶。此外, 复杂多糖中通常包含多种糖苷键, 每种独特的糖苷键都需要一种特殊的酶才能进行有效水解。因此, 每一种酶必须识别多糖分子中特定的化学键以及多糖分子链上的化学基团。多糖分子中的化学键类型、化学基团的种类、分子链的长短以及空间构型都增加了酶结合、切割和降解多糖的复杂性。此外, 由于空间排斥作用, 多糖降解酶难以切割深埋在高度复杂的多糖三维分子网络中的糖苷键^[2]。因此, 水解多糖骨架时 CAZymes 必须遵循正确的级联顺序, 如果缺失某种必需的酶, 多糖可能无法降解或仅仅被部分降解。

然而, 与我们对海洋氮、磷和硫循环中的具体步骤、产物和生物过程的了解相比, 我们对海洋环境中 CAZymes 驱动的有机碳循环的了解非常有限。这种认知的滞后是因为海洋中有机碳的转化涉及复杂的生化过程和众多的酶, 这种情况在多糖降解领域尤其突出。多糖是大部分浮游植物、大型藻类以及溶解性有机物(dissolved organic matter, DOM)和颗粒有机物(particulate organic matter, POM)的主要成分, 是海洋碳库的重要组成部分。最近针对海洋微生物宏转录组和宏基因组的研究进一步强调了多糖及其转化对海洋碳代谢的重要性^[3-4]。因此, 对海洋多糖的循环和驱动过程研究的重要性再次得到凸显。

为此, 本次综述中我们拟以 CAZymes 为重点, 尝试梳理最新的研究进展, 包括常见的海洋多糖和 CAZymes 的类型、多糖利用位点(polysaccharide utilization loci, PULs)、典型海

洋多糖的降解途径与机制, 以及藻华事件中的酶促降解多糖的过程与生态意义。目的是阐明多糖降解的生化基础与酶促降解反应的分子机理, 为理解海洋细菌的多糖代谢过程及其在海洋碳循环中的作用提供信息。此外, 利用 CAZymes 作为分子工具, 为解释生态事件的发生探寻新的思路。

1 海洋多糖概述

1.1 海洋多糖的种类

浮游植物和大型藻类是海洋食物网的基础, 是海洋环境中多糖的主要来源。通过光合作用产生的碳水化合物可作为细胞内能量存储和细胞壁的成分。藻类碳水化合物含量因物种和生长阶段而异, 其多糖含量多样而丰富(21%–50%)^[5]。除了它们的胞内多糖储备外, 藻类还主动分泌富含多糖的 DOM, 其中中性多糖(不带电荷的糖)占新分泌的 DOM 的一半^[6]。在一些大型藻类中, 海带多糖、海藻酸盐、硫酸盐、岩藻多糖、琼脂糖和角叉菜胶等作为细胞结构和细胞内储存化合物, 占细胞干重的 50% 以上^[7]。微藻(如底栖硅藻)产生的胞外多糖以及微生物被膜产生的粘液和覆盖物, 也贡献了海洋多糖的多样性和库存量。需要指出的是, 与其他类型的多糖相比, 纤维素类在海洋系统中相对较少, 常见的 7 大类海洋多糖类型和结构如表 1 所示。

1.2 海洋多糖的定性与定量分析

多糖的结构信息包括单体成分的鉴定、连接位置和分支方向的确定以及辅助官能团(例如硫酸盐、羧基或氨基)的鉴定等。对大多数 DOM 的分析通常采用酸水解, 然后是比色定量法或固态核磁共振分析法, 后者可提供样品总碳水化合物成分的信息^[8]。在一些酸水解过程中, 可以通过比较水解前后还原糖的含量来确

表 1 海洋源主要多糖类别与结构

Table 1 Main types and structures of marine polysaccharides

Marine polysaccharides	Sugar composition	Marine occurrence	Major CAZymes
Agar	β -1,4-D-galactose α -1,3-3,6-anhydro-L-galactose α -1,3-d-galactose	Red algae	GH16, GH117, GH50 α -agarase EC. 3.2.1.158 β -agarase EC 3.2.1.81
Alginate	β -1,4-D-mannuronic acid α -1,4-L-guluronic acid	Brown algae	PL7 Mannuronate lyase EC 4.2.2.3 Guluronate lyase EC 4.2.2.11
Carrageenan	β -1,4-D-galactose α -1,3-3,6-anhydro-D-galactose	Red algae	GH16 Carrageenase EC 3.2.1.83
Fucoidan	α -1,3-L-fucose, α -1,2-L-fucose α -1,2-D-glucuronic acid	Brown algae	GH29, GH107, GH168 α -L-fucosidase EC 3.2.1.51 α -1,3-1,4-L-fucosidase EC 3.2.1.111 Endo-fucoidanase EC 3.2.1.212
Laminarin	β -1,3-D-glucose β -1,6-D-glucose	Brown algae and diatoms	GH5 β -1,3-glucanase EC 3.2.1.6
Porphyran	β -1,4-D-galactose α -1,3-L-galactose	Red algae	GH16, GH86 β -porphyranase EC 3.2.1.178
Ulvan	β -1,4-D-xylose α -1,4-L-iduronic acid, β -1,4-D-glucuronic acid, α -1,4-L-rhamnose	Green algae	PL24, PL25, PL28 Ulvan lyase EC 4.2.2.-

定单体碳水化合物与聚合化合物的浓度^[9]。酸水解之后可以使用带脉冲电流的高效阴离子交换色谱进行单糖成分的分离和量化^[10]。特定的样品制备使高分子量 DOM 和 POM 中的中性、氨基和酸性糖类的分析成为可能^[11]；脱水糖也可以在特定色谱条件下使用带有脉冲电流检测的高效阴离子交换色谱进行定性定量分析^[12]。对于 POM 的分析,高度酸水解技术还可以提供其中碳水化合物的结构和组成的信息^[13]。需要指出的是,尽管海洋多糖经常含有硫酸盐或糖醛酸,但目前对这些成分的分析还较少,有待进一步的研究发现。

2 CAZymes 家族及其数据库

CAZymes 是一类超大酶家族,负责碳水化合物的合成、代谢、修饰及运输。CAZymes 主

要分为五类催化酶和一类非催化模块,催化酶包括糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GHs)、多糖裂解酶(polysaccharide lyases, PLs)、碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases, CEs)、糖基转移酶(glycosyltransferases, GTs)以及辅助氧化还原酶(auxiliary activities, AAs);而非催化模块即碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding modules, CBMs)。GHs 与 PLs 是多糖降解过程中两类重要的成员,作用是断裂多糖单体之间的糖苷键。GHs 的作用位点是多个碳水化合物间及碳水化合物与非碳水化合物间的糖苷键,糖苷键的断裂形成不同长度碳链的低聚糖。与 GHs 不同,PLs 则是通过 β -消除机制打开含糖醛酸的多糖长链,产生不饱和烯糖醛酸残基和新的还原性末端^[14]。CEs 是一组充当 GHs、PLs “助手”的酶,其作用是参与多糖酯

基、碳水化合物侧链的降解^[15]。GTs 与双糖、寡糖及多糖的合成有关，是一组催化糖基从活化的供体分子转移到特定的受体分子从而形成糖苷键的酶，在微生物的适应性和致病性方面起到重要作用^[16]。AAs 分为木质素水解酶 (ligninolytic enzymes) 和裂解多糖单加氧酶 (lytic polysaccharide mono-oxygenases)，其中木质素水解酶与经典的多糖解聚酶具有协同作用^[17]。CBMs 为 CAZymes 中具有碳水化合物结合活性的连续氨基酸序列，其本身没有酶活性，但可以通过促进与底物的长时间作用，增强多种 CAZymes 的催化功能。基于 CAZymes 家族的庞大性和重要性，该类家族拥有专门的数据库，即 CAZy 数据库 (<http://www.cazy.org>)。该数据库始建于 1999 年，用于提供 CAZymes 序列、结构及相关分子机制等综合信息。

随着测序深度和大数据的发展，近年来数据库新增了不少成员。Ndeh 等基于 PULs 鉴定出了 7 个新的 GH 家族^[18]，即 GH127、GH137、GH138、GH140、GH141 (α -2-*O*-methyl-L-fucosidase, α -2-氧-甲基-L-岩藻糖苷酶)、GH142 和 GH143 (2-keto-3-deoxy-D-lyxo-heptulosaric acid hydrolase, 2-酮基-3-脱氧-D-Lyx-庚二酸水解酶)。这些酶中，GH127 被表征为乙酸水解酶，GH137 和 GH142 含有 β -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (β -L-arabinofuranosidases)，而 GH138 和 GH141 分别含有 α -半乳糖醛酸酶 (α -galacturonidases) 和 α -L-岩藻糖苷酶 (α -L-fucosidases)。此外在 GH2 家族中发现了 β -D-半乳糖醛酸酶 (β -D-galacturonidase) 和 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (α -L-arabinopyranosidase)。之后，Luis 等发现另外两种新成员：GH146 和 GH147，它们可以解聚果胶中两种成分：同型半乳糖醛酸 (homogalacturonan) 和 I 型鼠李糖半乳糖醛酸 (type I rhamnogalacturonan, RG-I)^[19]。基于两者

分别含有新型的 β -L-阿拉伯呋喃糖苷酶和 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 的特征，它们共同参与了 RG-I 的分解。有趣的是，GH147 在海洋卵形拟杆菌 (*Bacteroides ovatus*) 中被发现，但在多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*) 中却不存在，主要原因可能在于多形拟杆菌中的 β -半乳糖苷酶活性被另一种 GH2 家族的 β -半乳糖苷酶所取代^[19]。

除了多糖利用位点，对阿拉伯半乳聚糖蛋白 (arabinogalactan proteins, AGPs) 的研究也发现了 3 个新的 CAZymes 成员，即 GH145、GH154 和 PL27^[20-22]。这些酶催化阿拉伯树胶 AGP (gum arabic AGP, GA-AGP) 中特定侧链的解聚。在编码 GH145 酶的 PULs 中，GA-AGP 的降解由 GH154 家族的成员完成，GH154 家族含有一个新的 β -葡萄糖醛酸酶 (β -glucuronidase)。在分子结构上，GH145 和 PL27 显示出 CAZymes 家族中常见的螺旋和 α 折叠。有趣的是，尽管存在经典的螺旋，但 GH145 酶的结构还存在一个不寻常的活性位点，即反向螺旋^[20]。定点诱变证实了这种反向的活性位点位置，并提出了一种涉及组氨酸残基的独特催化机制。另外，Ndeh 等发现了另一种多糖水解酶 PL29，存在于多种人体和海洋菌中，它具有裂解各种糖胺聚糖 (如硫酸软骨素、硫酸皮肤素和透明质酸) 的能力^[23]。

研究者们利用结构生物学方法发现了其他一些新成员。Abe 等发现来自海洋野居嗜几丁质菌 (*Chitinophaga arvensicola*) 的酶通过一种反相机理来切割 β -1,2-聚糖 (β -1,2-glycan)，因而 GH144 家族中第一个酶成员得到表征^[24]。该酶的重要特点在于能够切割 2 种聚糖结构，这一结果得到了晶体解析的支持，证实它拥有一个大的活性位点，可以容纳至少 7 个 β -葡萄糖 (β -glucose) 残基。Little 等发现了 GH153 家

族中两个新成员, 一个来自海洋博泰氏杆菌 (*Bordetella bronchiseptica*), 另一个来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[25]。系统发育分析表明, GH153 酶始终是双模块的, 并且在同一多肽上具有脱乙酰酶结构域。这些双模块酶能够解聚生物膜的主要成分聚- β -1,6-*N*-乙酰-D-葡萄糖胺 (poly- β -1,6-*N*-acetyl-D-glucosamine, PNAG)。另外, GH148、GH149 和 GH156 家族中的一些其他新酶也相继被发现^[26]。GH149 家族中包含裂解 β -1,3-葡聚糖(β -1,3-glucans)的酶; GH148 家族中一种新的 β -1,3-葡聚糖酶(β -1,3-glucanase)可以切割 β -1,3-1,4-葡聚糖(β -1,3-1,4-glucans); 而 GH156 家族中包含外分泌酶(exo- α -sialidases)。

基于水解酶家族的庞大性, 对新酶的挖掘和鉴定一直在持续, 数据库的信息也在不断更新中, 包括新型裂解多糖单加氧酶(lytic polysaccharide mono-oxygenase, LPMO)家族, 如 AA14 和 AA15。近 3 年新增的多糖水解酶家族如表 2 所示。

至于新型 CAZymes 家族成员多样性高的原因, Passow^[27]指出单糖的种类、连接方式、硫酸化或乙酰化修饰、多糖的长度和形式(线性、环状、装饰程度)为聚糖的多样性提供了生物学基础。此外, 多糖分子包含的额外官能团(硫酸根、氨基、甲基或乙酸根), 以及不同大小、电荷和物理状态的聚集体也使得多糖的复杂性和多样性进一步加大。

表 2 近 3 年新增的 20 种多糖水解酶家族

Table 2 The 20 families of degradative CAZymes reported during the past three years

Family	Actions	Mechanisms	Fold
GH137	n.d.	β -L-arabinofuranosidase	β propeller
GH138	Retaining	α -galacturonidase	(β/α) ₈
GH139	n.d.	α -2- <i>O</i> -methyl-L-fucosidase	
GH140	Retaining	β -1,2-apiosidase	(β/α) ₈
GH141	n.d.	α -L-fucosidase	β -helix
		α -2- <i>O</i> -methyl-L-fucosidase	
GH142	n.d.	β -L-arabinofuranosidase	(α/α) ₆
GH143	Retaining (inferred)	2-keto-3-deoxy-D-lyxo-heptulosaric acid hydrolase	β propeller
GH144	Inverting	Endo- β -1,2-glucanase	(α/α) ₆
GH145	Retaining	α -L-rhamnohydrolase	β propeller
GH146	Retaining	β -L-arabinofuranosidase	(α/α) ₆
GH147	Retaining (inferred)	β -galactosidase	(β/α) ₈ (inferred)
GH148	Retaining (inferred)	β -1,3-glucanase	(β/α) ₈ (inferred)
GH149	Inverting	β -1,3-glucan phosphorylase	(α/α) ₆
GH153	n.d.	poly- β -1,6-D-glucosamine hydrolase	(β/α) ₈
GH154	n.d.	β -glucuronidase	
GH156	Inverting	Exo- α -sialidase	
PL27	β -elimination	L-rhamnose- α -1,4-D-glucuronate lyase	(α/α) ₆
PL29	β -elimination	Hyaluronate lyase chondroitin-sulfate ABC endolyase dermatan sulfate lyase	
AA14	C-1 oxidation	Lytic xylan monooxygenase	Antiparallel β -sandwich
AA15	C-1 oxidation	Lytic cellulose monooxygenase lytic chitin monooxygenase	Antiparallel β -sandwich

n.d.: not defined.

3 CAZymes 功能的分子基础——多糖利用位点

3.1 多糖利用位点的作用模式

多糖利用位点(PULs)是与多糖分解代谢相关且位于特定区域的一组基因簇, 编码细胞表面多糖结合蛋白、外膜转运蛋白、碳水化合物活性酶和转录因子。多糖利用位点是自然选择下多酶协同、高效降解多糖物质的范例。

PULs 编码 TonB 依赖性转运蛋白(TonB-dependent transporters, TBDTs)、细胞表面多糖结合蛋白(cell surface glycan-binding proteins, SGBPs)、CAZymes 分子和碳水化合物传感器或转录调节因子的互补序列。拟杆菌属细菌作

为模式生物揭示了 PULs 的精细组成部分, 包括负责外膜淀粉识别和初始水解的蛋白质、聚糖向周质转运的蛋白质、将聚糖进一步水解为寡糖和单糖的蛋白酶和转录调节蛋白^[28]。在位点中共有 8 个基因被鉴定为单个基因簇的一部分, 统称为淀粉利用系统(starch utilization system, Sus), 它建立了复杂碳水化合物利用的基本范式^[29-30]。目前, 通过遗传、生物化学和结构方法对 Sus 的协同操作进行了深入剖析, 勾勒出了一个 PULs 通用的细胞模型(图 1)。

在这个模型中, PULs 的一个标志是至少存在一对有序的 SusC (starch utilization system C) 和 SusD (starch utilization system D)同源物, 它们分别编码外膜 TBDT 和 N 末端酯化的 SGBP。

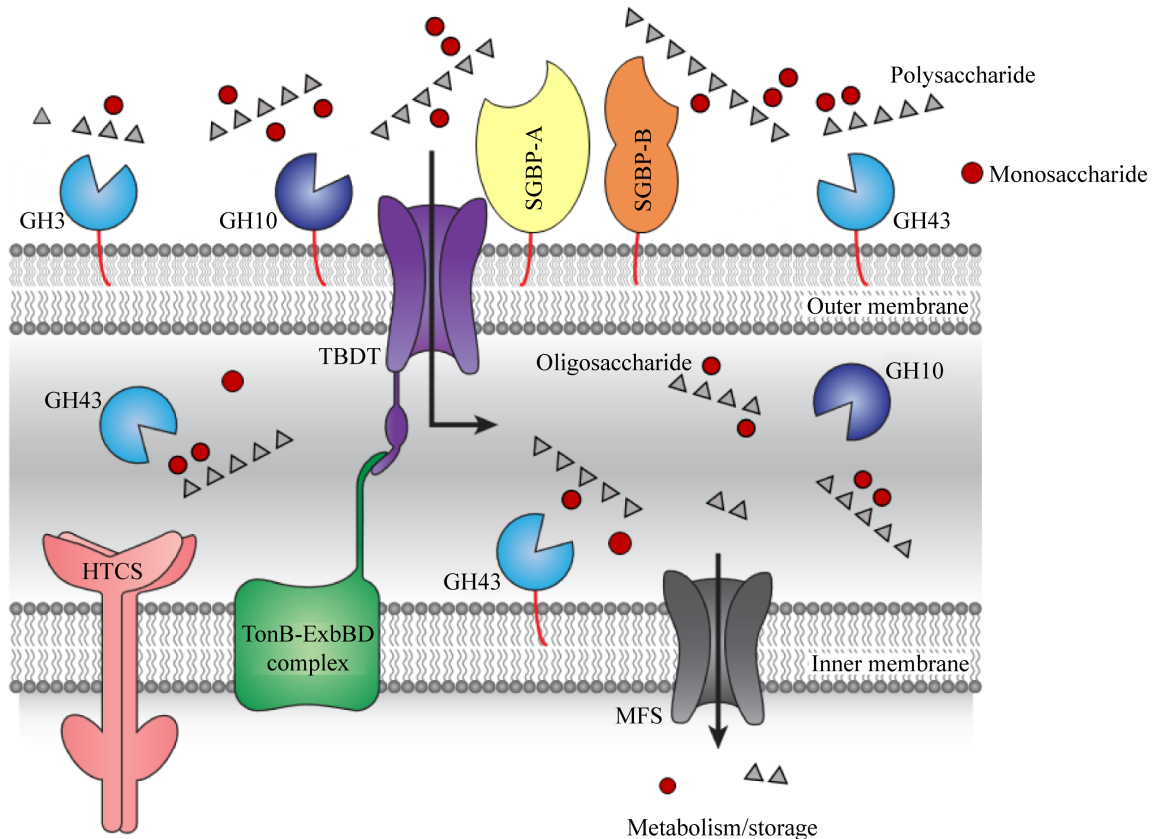


图 1 多糖利用位点功能示意图(改编自文献[31])

Figure 1 Function diagram of a PUL (modified from literature [31]).

鉴于 SGBP 之间的结构差异很大, SusD 同源物被称为 SGBP-A 蛋白。遗传学研究已揭示了 TBDT 和 SGBP-A 蛋白的密切相关性, SGBP-A 的缺失会削弱 PULs 功能; 然而如果底物结合已经通过定点突变消除, PULs 的功能可以通过与 SGBP-A 变体的互补来弥补^[32-34]。SGBP-A 同源物显示出强烈的一级、二级和三级结构保守性, 底物结合表面的拓扑变异解释了碳水化合物的特异性。最近的晶体结构研究揭示了 SGBP-A 同系物在其相关的 TBDT 的胞外开口处形成了一个柔性的“盖子”, 进一步表明 SGBP-A 在选择性底物转运中的可塑作用^[35]。

每个 PULs 还包含一组 CAZymes, 其任务是分解细胞表面结合的多糖^[36-37]; 多糖被内切酶或外切酶初步降解为低聚糖。产生的低聚糖片段被 TBDT (例如 SusC) 主动运输到周质空间中, 在细胞周质内低聚糖被糖苷酶类 GHs 等进一步水解, 最后生成分子量更小的寡糖或单糖, 最终被运输到细胞质内用于胞质代谢。在淀粉利用系统中, SusA (starch utilization system A) 和 SusB (starch utilization system B) 足以水解淀粉寡糖中的所有糖苷键。而针对更复杂的底物, PULs 通常具有多种糖苷酶。这一过程中胞外周质内的低聚糖作为转录调控的信号被调控因子识别, 从而调节多糖利用位点的表达。

3.2 多糖利用位点的调控方式

为了更高效地利用多糖, 多糖利用位点的基因簇中包含着不同的调控元件, 以不同的方式完成对多糖利用位点的调节。多糖利用位点的调控方式有 3 种, 包含 SusR (starch utilization system R) 调控器/感受器、细胞质外功能 σ 因子 (extracytoplasmic function sigma, ECF- σ)/反- σ 因子对 (anti- σ) 以及混合双组分系统 (hybrid two-component systems, HTCSs)。SusR 是一种

预测的跨内膜受体, 它结合淀粉来源的寡糖(但不结合葡萄糖), 并触发其余 Sus 基因的上调^[38]。ECF- σ /anti- σ 和 HTCSs 分别识别宿主多糖和植物多糖的水解产物。Anti- σ 识别来自黏液 O-连接聚糖中的低聚糖后, 将 ECF- σ 释放入细胞质, 与 RNA 聚合酶相互作用促进多糖利用位点的转录。HTCSs 是一个跨膜蛋白, 它从 N 末端到 C 末端依次包含碳水化合物感知域、组氨酸激酶结构域、响应调控域和 DNA 结合域。HTCSs 感知到周质内的低聚糖后发生磷酸化, 进行分子内的磷酸转移, 通过 DNA 结合域触发转录激活, 从而调控多糖利用位点的转录。无论 PULs 使用何种调节系统, 通常都会出现靶向动态反应所必需的精细调节信号; 单糖通常不是多糖利用位点的转录调控诱导因子^[39-40], 而是有可能作为抑制 PULs 表达的因子^[41]。在整个复杂的降解行为中, 多糖利用位点的调控机制使其对多糖的识别与水解更加精准而高效。

4 CAZymes 的酶促降解机制

碳水化合物的解聚需要许多不同功能的 CAZymes, 主要有糖苷水解酶、多糖裂解酶、糖苷转移酶、碳水化合物酯酶、碳水化合物结合模块和辅助氧化还原酶 6 大类, 按作用方式又可分为内切型酶和外切型酶, 前者在多糖链内切割, 后者从末端去除糖片段。糖苷水解酶是 CAZymes 中多样性最高的一类, 它们催化多糖分子链中糖苷键的水解。在含有糖醛酸残基的多糖中, 多糖裂解酶通过 β -消除机制催化糖醛酸残基上化学键的非水解裂解。除了切割各种单糖侧链的 GHs, 多糖骨架碳链的断裂还需要其他酶的参与, 如多糖硫酸酯酶去除硫酸酯基团^[42], 碳水化合物酯酶催化氧乙酰基和氮乙酰基的裂解^[43], 以及一些行使特殊功

能的“辅助活性”酶^[17]。最典型的例子是最近发现的来自海洋细菌嗜琼脂福尔摩沙菌(*Formosa agariphila*)和嗜半乳聚糖卓贝尔氏黄杆菌(*Zobellia galactanivorans*)的细胞色素 P450 单加氧酶。它们能特异性催化琼脂糖和紫菜多糖中存在的 6-氧-甲基-D-半乳糖(6-*O*-methyl-D-galactose)的去甲基化。只有在酶促羟基化和随后的分解步骤产生 D-半乳糖的游离羟基和甲醛之后,聚糖才能进一步被降解^[44]。因此,从上面的描述可以看出,多糖的降解过程涉及多种水解酶的参与。在下文中,我们选择紫菜聚糖、海带多糖和角叉菜聚糖这 3 种典型海洋多糖为例来具体阐述多糖降解机制(图 2)。

4.1 紫菜聚糖

紫菜聚糖由 2 种单糖组成,分别为 β -1,4-D-半乳糖和 α -1,3-L-半乳糖;前者携带有一个甲基,后者携带有一个硫酸酯基团。紫菜聚糖的多糖主链结构如图 2A 所示。紫菜聚糖降解的

第一步是 β -紫菜聚糖酶切割紫菜聚糖中 β -D-半乳糖和 α -L-半乳糖-6-硫酸酯之间的 β -1,4 糖苷键,得到初步水解产物——含硫酸酯基团的二糖。初步水解产物的硫酸酯基在硫酸酯酶的作用下被去除,得到二级代谢产物——含 α -1,3 糖苷键连接的二糖。该二糖继续在 α -半乳糖苷酶的催化作用下解链为一个 D-半乳糖和一个 L-半乳糖。在海洋环境中第一个研究的 β -紫菜聚糖酶来自于嗜半乳聚糖卓贝尔氏黄杆菌^[46],属于 GH16 家族。随后从普通拟杆菌(*Bacteroides plebeius*)中鉴定出了 GH86 家族中一种新的 β -紫菜聚糖酶^[47],进一步研究表明 GH16 家族中的紫菜聚糖酶本身不足以完全降解紫菜多糖,它们需要多种协同切割侧链基团的酶,这些酶将多糖链从官能团上脱离,从而使紫菜聚糖得以进一步降解。此外, P450 单加氧酶催化 6-氧-甲基-D-半乳糖的去甲基化^[44],这些 P450s 单加氧酶对紫菜聚糖的完全分解至关重要。

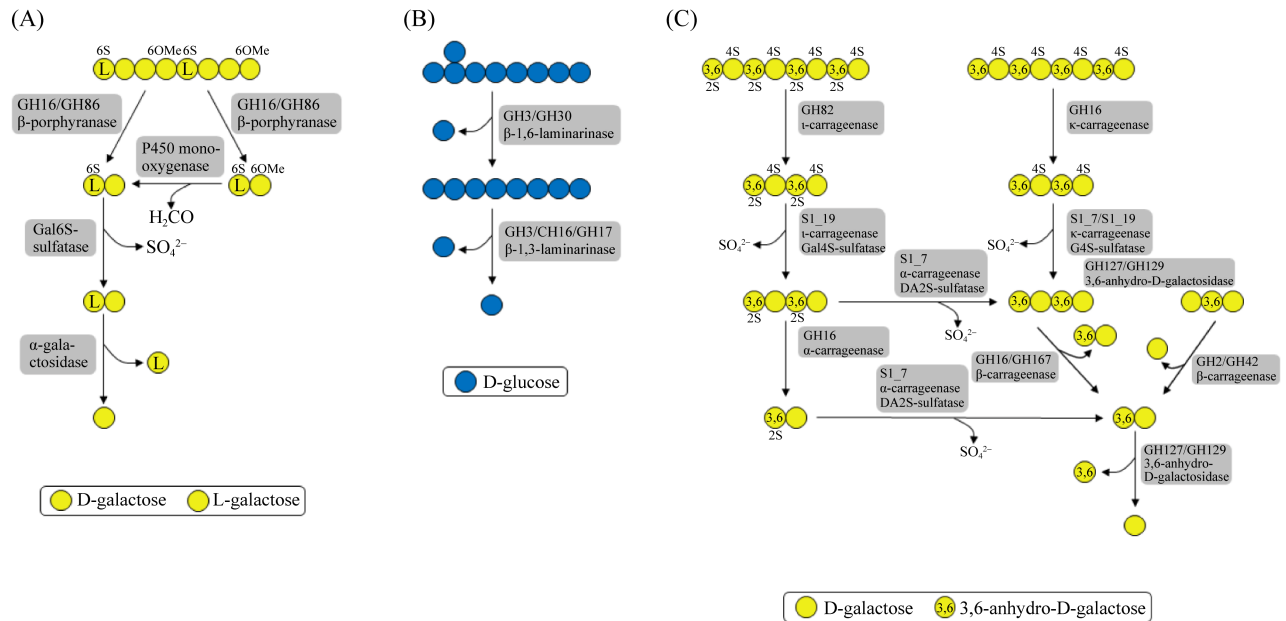


图 2 CAZymes 降解紫菜聚糖(A)、海带多糖(B)和角叉菜聚糖(C)的代谢途径(改编自文献[45])

Figure 2 Metabolic pathways of porphyran (A), laminarin (B) and carrageenan (C) degraded by CAZymes (modified from literature [45]).

4.2 海带多糖

海带多糖是最丰富的海洋多糖之一, 常见于褐藻、硅藻^[48]。它是一种高水溶性葡聚糖, 由线性 β -1,3-糖苷键连接的 D-葡萄糖和 β -1,6-糖苷键连接的 D-葡萄糖侧链组成。海带多糖的解聚需要两种海带多糖酶的参与(图 2B), 分别是内切型 β -1,3-葡聚糖酶(β -1,3-海带多糖酶)和外切型 β -1,3-葡聚糖酶。外切型葡聚糖酶从海带多糖的非还原性末端切割 β -1,6-糖苷键, 得到不含侧链的 D-葡萄糖主链; 然后在内切型葡聚糖酶的水解作用下切割 β -1,3-糖苷键, 得到单糖 D-葡萄糖。内切型葡聚糖酶在分组上被归类为 GH3、GH16 和 GH17 家族, 而外切型葡聚糖酶主要出现在 GH3 和 GH30 家族中。GH16 家族中的海带多糖酶可以切割 β -1,3-糖苷键和 β -1,4-糖苷键, 但 GH17 酶对未修饰的 β -1,3-葡聚糖具有高度特异性^[49]。对来自嗜琼脂福尔摩沙菌 *F. agariphila* KMM 3901^T 的 GH16、GH17 家族酶和来自福尔摩沙菌属 *Formosa* sp. Hel1_33_131 的 GH30 家族酶的研究发现^[48], GH16 家族中的海带多糖酶与来自嗜半乳聚糖卓贝尔氏黄杆菌中的 2 种内切型海带多糖酶分别具有 44% 和 43% 的相似性。GH17 家族中的海带多糖酶是对 β -1,3-葡聚糖具有特异性的内切型酶, 而 GH30 家族中的海带多糖酶是对 β -1,6-葡聚糖具有特异性的外切型酶。因此, 来自 GH17 家族的内切型酶是海带多糖骨架解聚所必需的, 而 GH30 家族中的外切型酶负责水解海带多糖侧链。除此之外, 关于海洋坎氏弧菌(*Vibrio campbellii*) 海带多糖酶(GH3)的研究显示, GH3 家族中的海带多糖酶能够切割 β -1,3-糖苷键、 β -1,4-糖苷键和 β -1,6-糖苷键(图 2B)^[50]。海洋拟杆菌中也存在相应的海带多糖降解酶, 嗜角叉菜假单胞菌含有几种内切型 1,3- β -葡聚糖酶(GH16)的基因, 这些基因编码在嗜角叉菜假交替单胞菌

(*Pseudoalteromonas carrageenovora*) 的两条染色体上。在已经研究过的 52 个假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas*) 基因组中, 有 47 个具备相应保守的 PULs 结构^[51]; 对 53 个海洋细菌分离株的基因组研究发现, 400 个 PULs 中有 46 个 PULs 被认为是靶向海带多糖的^[49]。可见, 海带多糖的分解在海洋多糖周转中起重要作用。

4.3 角叉菜聚糖

除琼脂外, 角叉菜聚糖是大型红藻的细胞壁多糖, 它们的结构非常复杂, 并具有种属差异性。 ι -角叉菜聚糖、 κ -角叉菜聚糖和 λ -角叉菜聚糖是 3 种主要的角叉菜聚糖。其中 ι -角叉菜聚糖单体主要由带硫酸酯基团的 α -1,3-3,6-脱水-D-半乳糖(α -1,3-3,6-anhydro-D-galactose)和带硫酸酯基团的 β -1,4-D-半乳糖(β -1,4-D-galactose)组成; κ -角叉菜聚糖主要由带 α -1,3-3,6-脱水-D-半乳糖(α -1,3-3,6-anhydro-D-galactose)和带硫酸酯基团的 β -1,4-D-半乳糖(β -1,4-D-galactose)组成; λ -角叉菜聚糖主要由带硫酸酯基团的 β -1,4-D-半乳糖(β -1,4-D-galactose)组成。角叉菜聚糖分解到单体水平需要多种不同的 CAZymes 共同参与。

如图 2C 所示, ι -角叉菜聚糖的第一步是由 GH82 家族的 ι -角叉菜聚糖酶将多糖链切割成更小的寡糖短链。在 κ -角叉菜聚糖中, 第一步由 GH16 家族的 κ -角叉菜聚糖酶将多糖链切割成更小的寡糖短链。低聚的 ι -角叉菜聚糖需要通过 S1_19 家族的 ι -角叉菜聚糖 Gal4S-硫酸酯酶(ι -carrageenan Gal4S-sulfatase)对 β -1,4-D-半乳糖残基进行脱硫, 从而产生低聚的 α -角叉菜聚糖。类似的步骤也发生在 κ -角叉菜聚糖中, 这里 κ -角叉菜聚糖 G4S-硫酸酯酶(κ -carrageenan G4S-sulfatase)水解 β -1,4-D-半乳糖残基的硫酸酯, 得到不带硫酸酯基团的 β -角叉菜聚糖。为了将 α -角叉菜聚糖转化为不带硫酸酯基团的

β -角叉菜聚糖, 需要通过 S1_7 家族的 α -角叉菜聚糖 DA2S-硫酸酯酶(α -carrageenan DA2S-sulfatase)对 α -1,3-3,6-脱水-半乳糖残基进行脱硫。最后, GH127 或 GH129 家族的 3,6-脱水-D-半乳糖苷酶和 GH2 家族的 β -半乳糖苷酶可以从非还原端连续降解不带硫酸基团的 β -角叉菜聚糖, 直至得到单体产物 3,6-脱水-D-半乳糖(3,6-anhydro-D-galactose)和 D-半乳糖^[52]。

5 多糖在海洋环境中的降解模式

5.1 多糖水解菌及其 CAZymes

海洋微生物是海洋环境中多糖转化的主要承担者, 其中海洋真菌和细菌在降解海洋多糖过程中起主导作用, 两者对全球海洋碳循环意义巨大。

海洋真菌是海洋环境中藻类多糖的主要消费者, 它们能产生对海洋多糖具有特异性的酶, 如海带多糖酶、褐藻聚糖酶、石莼胶聚糖酶、角叉菜聚糖酶和琼脂酶^[53-54]。研究海洋真菌的碳水化合物活性酶, 有助于阐明真菌对于海洋环境中多糖降解的贡献。用藻类多糖培养海洋真菌并对酶的表达谱进行研究可以揭示海洋真菌的营养偏好和 CAZymes 库^[55]。目前对 CAZymes 基因表达调控分子水平的理解主要参考自陆生真菌, 对于海洋环境中真菌及其 CAZymes 的基因表达调控还稍显缺乏, 等待进一步的研究。

相比于真菌, 细菌对多糖的降解信息相对丰富。海洋中存在多样的多糖水解细菌, 占主导地位细菌包括拟杆菌门(*Bacteroidetes*), γ -变形杆菌纲(*Gammaproteobacteria*), 浮霉菌门(*Planctomycetes*)以及疣微菌门(*Verrucomicrobia*)等^[56-59], 这些细菌能对有机物做出快速反应, 常被视为多糖代谢的先锋物种。海洋拟杆菌中含有丰富的多糖利用位点, 能利用不同的碳源物质, 其高效的多糖降解系统以及高量产短链

脂肪酸的性质, 使之成为在海洋菌群的多糖转运利用方面研究得最多的菌种。此外, 海洋中拟杆菌门的成员, 特别是通常与微藻和大型藻共生的黄杆菌, 被认为是关键的多糖降解菌。在葡萄糖上生长的麦氏交替单胞菌(*Alteromonas macleodii*)细胞中观察到藻酸盐裂解酶的低基础表达, 但在藻酸盐存在时表达增加了 5-72 倍^[60]。这些结果表明多糖降解菌具有底物依赖性和环境选择性。多糖降解细菌通常拥有相似的生态位, 因而系统发育特征也相对较近。这为判断多糖降解中潜在作用提供了线索, 也为可能存在的水平基因转移提供了判定依据^[51,61]。多糖降解细菌的能力受到多种条件的影响, 包括目标多糖的复杂性、水平基因转移、以及基因组特征等。在第一种因素中, 海洋细菌和 CAZymes 的种类多样性会随着其目标多糖的复杂性而扩展, 这意味着水解高度复杂的多糖需要大量的 CAZymes 储备或基因冗余, 这一点已在黄杆菌属嗜半乳聚糖卓贝尔氏黄杆菌中角叉菜聚糖的特异性硫酸酯酶^[52]以及福尔摩沙菌属(*Formosa*)的海带多糖酶^[62]中得到证明。在第二种(水平基因转移)因素中, 一些海洋 γ -变形杆菌纲缺少部分多糖利用位点^[51], 分子信息表明进化边界限制了水平基因转移, 或者不同环境下的 γ -变形杆菌依赖于不同的多糖降解策略。第三种影响因素(基因组)中, 研究发现在更大和更复杂的基因组中存在比更小和更简单的基因组中更为精细的调节。基因组较大的细菌只有在与相关底物接触时, 才能诱导其全部 CAZyme 的表达, 如降解硫酸软骨素的极地杆菌(*Polaribacter*)^[63]和降解藻酸盐的嗜半乳聚糖卓贝尔氏黄杆菌^[61]。而较小的基因组在利用多糖时相对简单, 且遵循优先顺序。例如麦氏交替单胞菌在利用多糖底物时存在优先顺序, 海带多糖最先被利用^[64]。

5.2 海洋环境中多糖降解的表征方法

CAZymes 是异养微生物用来启动海洋多糖降解的基本工具, 这些酶的活性和结构特异性决定了哪些有机物可以被水解成更小的尺寸并运输到细胞中进行代谢^[65]。它们还决定哪些多糖组分可以避免再矿化, 或可能导致在地质时间尺度上以沉积物形式保存下来。不同的异养微生物协同工作有利于复杂有机物的降解。由于异养细菌群落中的集体酶活性是多糖不稳定性的关键决定因素, 整合海水和沉积物中细菌群落酶活性的测量一直是研究的热点。测量微生物酶活性的最常见方法是依赖于荧光底物替代物的方法(甲基伞形酮磷酸酯- α -葡萄糖和甲基伞形酮磷酸酯- β -葡萄糖)。在过去的几十年里, 用这些基质进行的酶活性测量揭示了海洋中的许多生态现象。例如, 葡萄糖苷酶的活性在表层海洋中比在深层海洋中高得多^[66]; 在颗粒和聚集体上, 葡萄糖苷酶的活性同样比周围水柱中的活性高出许多^[67-68]; 此外, 在深海沉积物和海沟环境中, 葡萄糖苷酶也显示出一定的生物活性^[69]。

替代底物可以快速评估酶的活性, 但它们对于酶的具体类别和结构特异性的了解十分有限。特别是低分子量替代底物既不代表天然多糖的结构复杂性, 也不能测量内切型酶的活性。此外, 对浮游植物、藻类、DOM 和 POM 的分析表明, 葡萄糖只是构成海洋多糖的众多单糖之一。因此, 外切型葡萄糖苷酶活性的测量不能提供海洋中多糖降解的全面视图。

荧光团标记的多糖^[70]提供了一种替代方法来测量海水和沉积物、颗粒和聚集体中的多糖水解速率和模式。使用荧光团标记, 多糖被标记为一个共价连接的荧光团, 水解效果可用多糖分子量的变化得以表征^[71]。该方法既可以表征内切型酶活性, 又可以表征外切型酶活

性, 有助于比较结构不同的多糖水解速率。在具体的生态事例中, 使用荧光标记多糖的研究方法揭示了大规模藻华期间整个微生物群落(而不仅仅是单个生物体)获取多糖的能力, 证实了藻际微生物群落在不同发生时期代谢多糖的差异, 表明底物依赖性塑造藻际群落的主要因子之一^[4,71]。此外, 荧光标记多糖的方法证明了多糖水解的速率和底物谱通常随着海洋深度的增加而变窄^[72-76]; 且海雪聚集体中酶活性谱宽度会随着聚集体的尺寸而变化^[77], 背后的生态机制是微生物被膜(biofilm)的形成和群体感应(quorum sensing)信号的调节作用^[78]。

5.3 多糖降解的新模式

海洋细菌产酶与海洋多糖的酶促降解之间的平衡关系通常被看做海洋细菌群体的微生物策略^[79-80]。为了更好地理解这一问题, 我们可以简化地设想: 细菌产生的胞外酶, 无论是结合在细胞表面的还是释放到环境介质中的游离酶, 对细菌来说是一种生存成本, 只有当细菌获得的水解产物补偿了酶的产生时, 这种成本才是有益的。这些成本和收益模式已经在模型中进行了探索, 模型还考虑了不产生胞外酶的生物体能够从酶促多糖水解产物中获益的程度^[79,81]。结合在细胞表面的酶可能使得底物水解和产物吸收之间的耦合更紧密, 从而使产酶细胞能够保留更多的酶促水解产物^[80]。然而, 对于不溶性底物的降解需要依赖细菌释放到胞外的游离酶, 因为酶与细胞表面的紧密结合会限制细胞与胞内水解底物的接触。值得注意的是, 通过游离酶进行的底物水解可能导致与竞争对手共享水解产物^[82]。

Reintjes 等^[57]发现表层海水中相当一部分(高达 25%)的细菌能够水解多糖并吸收水解产物, 而很少有水解产物的损失, 这种获取底物

的模式被描述为“自私行为”。我们以一个简单模型来了解期间的具体过程，该模型称为“三角模型”^[83] (图 3)，这一模型中包括自私细菌(selfish bacteria)、外部水解细菌(external hydrolyzers)，以及充当被动寡营养细菌(oligotrophs)的“欺骗者”细菌。自私摄取和外部水解之间的平衡有可能影响环境介质中溶解性碳水化合物的大小范围，从而影响被动寡营养菌的种群丰度^[83]。最近在德国北海黑尔戈兰岛(Helgoland)针对藻类爆发期间的一项调查证实了这一模型的假设。在藻华初期，水解细菌数量较少，异养细菌依靠“自私”机制摄取的多糖丰度相对较低，并且只有少数底物在细胞外部水解^[84]。随着藻华的进行，“自私”吸收显著增加，胞外水解速率也同步增加，自私细菌和外部水解细菌数量相当。进入到藻华后期，随着细菌细胞数量的增加，“自私”细菌活性下降，底物丰度和复杂度以及胞外酶的

活性仍然很高^[84]，此时“欺骗者”细菌顺势而增殖且达到峰值。在这期间多数多糖(葡萄糖、果糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖、鼠李糖、岩藻糖、甘露糖、糖醛酸)的代谢都异常活跃，并与主导物种的组成相匹配。值得注意的是，海带多糖的降解没有遵循这种模式，而是表现出水解速率与自私吸收的同步增加，而阿拉伯半乳糖仅以自私的方式被吸收而不被外部水解细菌水解。该结果表明，针对特殊的多糖类别，“自私”吸收和外部水解遵循了不同的轨迹。

除了上述观察结果，研究者们还发现：自私细菌存在于北大西洋水深为 3 000–5 500 m 的底部水域，这些细菌吸收了在相同深度没有在细胞外部水解的多糖。这些观察使我们推测：面对海洋多糖的不同可用性和结构复杂性，碳利用机制之间存在紧密的相互作用。该假设解释了海洋中的 DOM 和 POM 利用机制的

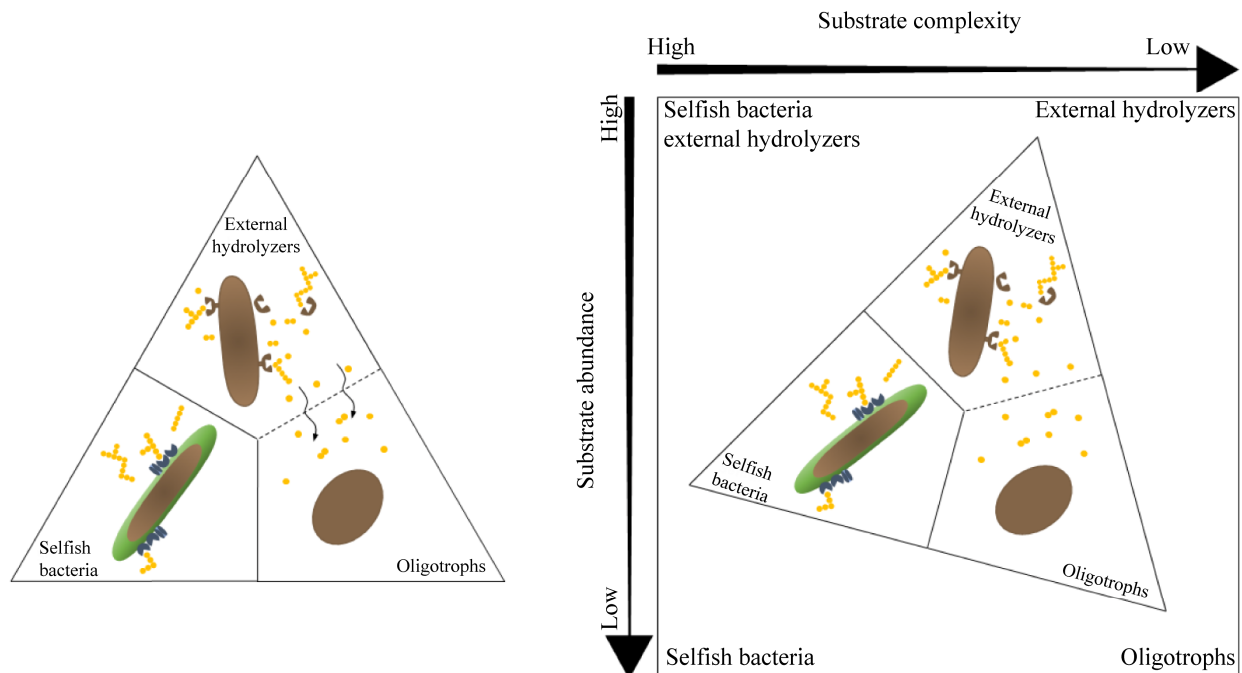


图 3 多糖降解的三角模型(改编自文献[65])

Figure 3 A new model of polysaccharide degradation that includes three types of bacteria (modified from literature [65]).

差异——“自私吸收”和“外部水解”,以及它们与多糖数量和复杂性的关系。我们将多糖利用细菌分为快速响应的外部水解菌;积累资源的自私细菌以及充当被动寡营养细菌的“欺骗者”细菌^[85]。将三者置于一个矩阵上以考察海洋中的多糖结构和储备(图 3)。矩阵中,轴定义了从高到低的结构复杂性和底物丰度,象限由 3 类不同的成员所支配。高丰度的复杂多糖可由外部水解菌或自私细菌获得,低丰度的复杂多糖主要由自私细菌获得;高丰度的简单多糖主要由外部水解菌利用,而在低丰度的多糖环境中,被动寡营养细菌利用结构相对简单的底物。该模型表明,复杂多糖只有在与具有能够产生特定酶系的细菌共存时才具有生物可利用性,这些酶系可以将它们水解成更小的亚基。这些酶系受制于遗传和能量成本,因此在细菌中分布不均匀^[86-87]。此外,细菌本身在海洋中也存在时空异质性^[3-4,60,88]。因此,该模型证实了前述的假设,即 POM 和 DOM 的高可变性与异养微生物群落的酶促降解能力密切相关。同时,该矩阵为我们展示了不同海洋环境下区分共养型和寡养型的一种方法^[89]。细菌使用不同的策略摄取复杂有机物:多糖丰度较高时外部水解菌

的功能就强,此时受限于空间和扩散限制,它们会形成密集斑块,以便于获得足够的酶投资回报^[90]。对于自私细菌而言,由于它们不共享所产生的水解产物^[37],因此无论环境中的多糖丰度高还是低,它们在高度复杂的酶机制协调下更为有效。但是需要注意的是,自私细菌的这种营养方式需要承担一定的代价,即在生长上表现得比外部水解菌生长慢。因此,这一模型也为理解海洋中多糖循环与物种组成提供了新的思路。

6 藻华事件中多糖的降解特征

Telling 等的数据显示了藻际细菌的多样性和功能储备模式,证实藻华事件具有很强的重现性,且功能水平比分类水平更明显,这一现象得到了 CAZymes 基因库的支持^[4]。底物化学成分的改变可能是响应藻类增殖和细菌 CAZymes 演替的驱动力^[3-4,91]。不同 CAZymes 的高表达与活性谱差异反映了不同赤潮阶段的多糖异质性。研究海洋环境中的 CAZymes 为海洋细菌利用多糖提供了新的视角。利用有关数据我们可以构建异养细菌多糖利用模型并对生态事件的形成机制给出解释(图 4)。在藻华初

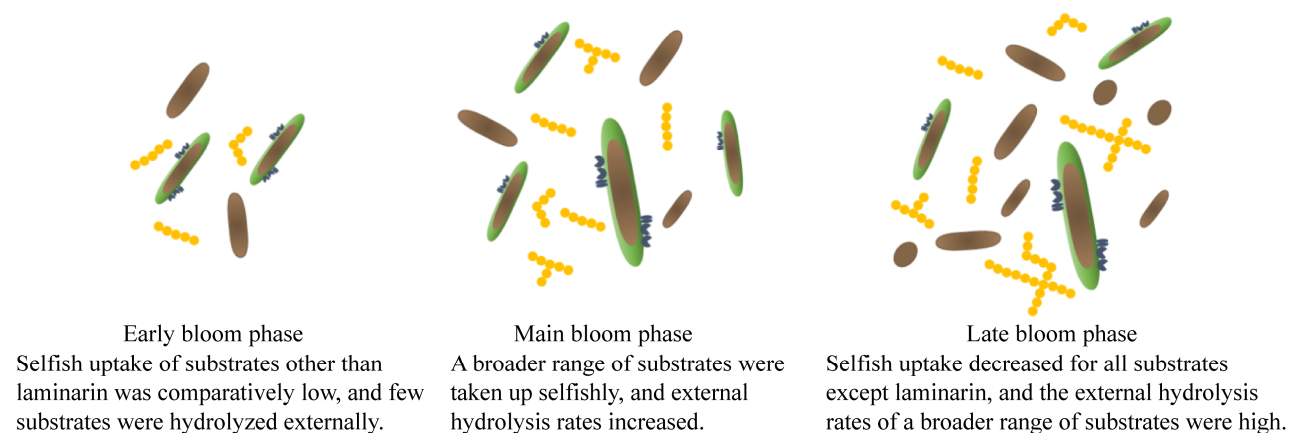


图 4 赤潮期间多糖利用的简化模式(改编自文献[65])

Figure 4 Polysaccharides uptake during the course of an algal bloom (modified from literature [65]).

期, 水解细菌最初很丰富, 然后底物发生外部水解其丰度逐渐降低。随着藻华的进行, 多糖被大量自私细菌吸收, 同时以高速率被外部水解菌利用, 形成自私菌与水解菌共存的状态, 这显示出低浓度的高复杂多糖会成为自私细菌的特异性目标。进入藻华末期, 一些被动寡营养细菌出现, 它们具有代谢更低浓度多糖的能力, 其代谢产物可供周围的细菌和宿主藻类使用, 在藻华的维持上具有一定的作用。此外, 多糖的利用特征也帮助我们解释为什么在不同的阶段有不同的主导物种, 这主要是源自物种对藻华特定阶段的底物偏好性。例如, 黄杆菌比 γ -变形杆菌更依赖于多糖, 这可以解释为什么黄杆菌重复出现在所有赤潮阶段, 而 γ -变形杆菌更多出现在赤潮末期。

在我们前期的研究中^[92], 对甲藻赤潮的多糖降解也进行了分析, 发现在藻华开始时大多数可利用的多糖是胞外多糖; 随着藻华进行, 藻类细胞逐渐衰老, 越来越多的藻类底物被释放; 进入藻华末期, 底物达到高潮。细菌会优先利用更易降解的底物, 如海带多糖, 然后再消耗更难降解的底物, 如硫酸多糖。这种选择性摄食提供了一系列的底物生态位, 以供特异性的浮游细菌生长。藻类衍生有机物的供应是决定浮游细菌组成的主要因素之一, 多糖在此期间发挥了底物诱导作用。为此, 我们推测, 可以借助多糖的降解方式构建生态模型, 用于指示赤潮的形成和发展过程。

7 小结与展望

近 20 年里人们对海洋 CAZymes 的类型、功能和代谢机制进行了诸多研究, 取得了瞩目的进展。然而, 考虑到海洋环境的动态变化, CAZymes 家族的复杂性和微生物种类的多样

性, 一些重要的生化过程还有待我们去进一步的认识, 多糖和 CAZymes 的复杂性既提供了机遇, 也带来了挑战。综合现有的文献, 我们梳理了未来值得关注的几大问题。

(1) CAZymes 及其底物的精细匹配需要严谨的实验研究和科学解释。这可以提供海洋环境中不同多糖的存在和相关性, 以及它们对特定微生物的重要性线索。许多蛋白质属于已知的 CAZymes 家族和亚家族, 有确定的可利用底物范围。结合 PULs 的相关知识, 基因预测可以提供有关多糖在环境中假定结构的线索。多糖水解酶的活性数据可以为海洋中不同时间和地点的特定多糖和微生物群落的关系提供重要线索。

(2) 寻找更有效地表征海洋多糖的结构和数量的实验方法。有前景的新方法包括使用来自海洋细菌的特征明确的 CAZymes 作为选择性工具来量化特定的多糖^[48]。这种方法最近被用来测定海带多糖含量, 作为评估对海洋中 POM 的贡献的指标^[5]。用海带多糖水解酶对 POM 提取物进行处理, 然后用相应成熟的方法对水解产物进行定量。原则上, 类似的方法可以用于各种各样多糖的表征; 进一步的应用需要鉴定和指示特定的海洋环境中的 CAZymes^[48]。

(3) 碳水化合物微阵列使用工具的拓展。全面的微阵列聚合物分析包括从目标材料中进行几次连续提取, 然后由微阵列打印。所得的微阵列使用多糖特异性探针以检测不同提取物中的多糖表位^[93]。微阵列在海洋中的应用表明, 大型藻类中存在阿拉伯半乳聚糖蛋白 (arabinogalactan proteins), 以及大型藻类释放的多糖混合物^[94-96]。微阵列方法还可用于追踪海洋多糖存量的变化, 并与其他生物地球化学测量方法相结合, 用于长时间的海上原位测量,

以获取特定多糖及相关碳水化合物结合模块的高分辨率剖面信息^[97]。

(4) 将细菌功能和酶的多样性结合起来, 通过多糖降解过程中群落模式的组学研究及基于生物的新型 CAZymes 的鉴定和表征相结合, 将为新的 CAZymes 的鉴定和表征提供新的途径。单菌的分离培养仍然是一个重要的手段, 它可以提供完整的细菌基因组, 使细菌的生理和表型假设可以得到很好的验证^[60,98]。基因信息的深度挖掘将继续为多糖降解的酶学机制提供新的见解^[99-100], 并可协助发现新的 CAZymes 成员。以组学和培养学相结合也有助于破译不可培养细菌的 CAZymes 库, 提供细菌可利用底物的偏好信息^[86]。

(5) 研究生境的延伸。相比于浅海和表层海水, 我们对深海和沉积物中微生物的多糖降解能力还知之甚少^[101-103]。这需要对特殊环境(极地、海沟、冰川、热液等)的细菌进行富集、分离和鉴定, 并采用生物化学法和组学方法对 CAZymes 的功能和结构进行表征^[99,104-105], 以认识不同生境下的多糖利用方式, 深入理解群落中菌群的互作关系和环境适应机制。

(6) 多糖转化和酶活性周期的深入关注。海洋中多糖的代谢过程还存在关键问题有待解答: 哪些因素控制着海洋中多糖的获取? 多糖可以作为能源快速循环, 但深海沉积物中碳水化合物的存在和下沉颗粒中的 POM 表明, 一些多糖有机质规避了酶的降解, 证明胞外酶的功能受环境条件限制^[106]。细菌附着在颗粒上是否会影响酶的扩散, 从而影响水解产物被微生物群落利用的程度^[68]。为了解答这一问题, 我们需要对原位的多糖及 CAZymes 进行稳定同位素或荧光标记来获取定性和定量的信息, 以深入认识海洋环境中多糖的动态变化和酶的活性周期。

参考文献

- [1] Falkowski PG, Barber RT, Smetacek VV. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*, 1998, 281(5374): 200–207.
- [2] Reisky L, Préchoux A, Zühlke MK, Bäumgen M, Robb CS, Gerlach N, Roret T, Stanetty C, Larocque R, Michel G, Song T, Markert S, Unfried F, Mihovilovic MD, Trautwein-Schult A, Becher D, Schweder T, Bornscheuer UT, Hehemann JH. A marine bacterial enzymatic cascade degrades the algal polysaccharide ulvan. *Nature Chemical Biology*, 2019, 15(8): 803–812.
- [3] Teeling H, Fuchs BM, Becher D, Klockow C, Gardebrecht A, Bennke CM, Kassabgy M, Huang SX, Mann AJ, Waldmann J, Weber M, Klindworth A, Otto A, Lange J, Bernhardt J, Reinsch C, Hecker M, Peplies J, Bockelmann FD, Callies U, Gerdts G, Wichels A, Wiltshire KH, Glöckner FO, Schweder T, Amann R. Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Science*, 2012, 336(6081): 608–611.
- [4] Teeling H, Fuchs BM, Bennke CM, Krüger K, Chafee M, Kappelmann L, Reintjes G, Waldmann J, Quast C, Glöckner FO, Lucas J, Wichels A, Gerdts G, Wiltshire KH, Amann RI. Recurring patterns in bacterioplankton dynamics during coastal spring algae blooms. *eLife*, 2016, 5: e11888.
- [5] Becker S, Tebben J, Coffinet S, Wiltshire K, Iversen MH, Harder T, Hinrichs KU, Hehemann JH. Laminarin is a major molecule in the marine carbon cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(12): 6599–6607.
- [6] Hama T, Yanagi K, Hama J. Decrease in molecular weight of photosynthetic products of marine phytoplankton during early diagenesis. *Limnology and Oceanography*, 2004, 49(2): 471–481.
- [7] Mabeau S, Kloareg B. Isolation and analysis of the cell walls of brown algae: *Fucus spiralis*, *F. ceranoides*, *F. vesiculosus*, *F. serratus*, *Bifurcaria bifurcata* and *Laminaria digitata*. *Journal of Experimental Botany*, 1987, 38: 1573–1580.
- [8] Mao JD, Kong XQ, Schmidt-Rohr K, Pignatello JJ, Perdue EM. Advanced solid-state NMR characterization of marine dissolved organic matter

- isolated using the coupled reverse osmosis/electrodialysis method. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(11): 5806–5814.
- [9] Myklestad SM, Skånøy E, Hestmann S. A sensitive and rapid method for analysis of dissolved mono- and polysaccharides in seawater. *Marine Chemistry*, 1997, 56: 279–286.
- [10] Borch NH, Kirchman DL. Concentration and composition of dissolved combined neutral sugars (polysaccharides) in seawater determined by HPLC-PAD. *Marine Chemistry*, 1997, 57: 85–95.
- [11] Engel A, Händel N. A novel protocol for determining the concentration and composition of sugars in particulate and in high molecular weight dissolved organic matter (HMW-DOM) in seawater. *Marine Chemistry*, 2011, 127: 180–191.
- [12] Nouara A, Panagiotopoulos C, Sempéré R. Simultaneous determination of neutral sugars, alditols and anhydrosugars using anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: application for marine and atmospheric samples. *Marine Chemistry*, 2019, 213: 24–32.
- [13] Lin P, Guo LD. Spatial and vertical variability of dissolved carbohydrate species in the northern Gulf of Mexico following the deepwater horizon oil spill, 2010–2011. *Marine Chemistry*, 2015, 174: 13–25.
- [14] Lombard V, Bernard T, Rancurel C, Brumer H, Coutinho PM, Henrissat B. A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics. *The Biochemical Journal*, 2010, 432(3): 437–444.
- [15] Biely P. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(6): 1575–1588.
- [16] Zhu F, Zhang H, Wu H. Glycosyltransferase-mediated sweet modification in oral streptococci. *Journal of Dental Research*, 2015, 94(5): 659–665.
- [17] Levasseur A, Drula E, Lombard V, Coutinho PM, Henrissat B. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 41.
- [18] Ndeh D, Rogowski A, Cartmell A, Luis AS, Baslé A, Gray J, Venditto I, Briggs J, Zhang XY, Labourel A, Terrapon N, Buffetto F, Nepogodiev S, Xiao Y, Field RA, Zhu YP, O’Neil MA, Urbanowicz BR, York WS, Davies GJ, Abbott DW, Ralet MC, Martens EC, Henrissat B, Gilbert HJ. Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions. *Nature*, 2017, 544(7648): 65–70.
- [19] Luis AS, Briggs J, Zhang XY, Farnell B, Ndeh D, Labourel A, Baslé A, Cartmell A, Terrapon N, Stott K, Lowe EC, McLean R, Shearer K, Schückel J, Venditto I, Ralet MC, Henrissat B, Martens EC, Mosimann SC, Abbott DW, Gilbert HJ. Dietary pectic glycans are degraded by coordinated enzyme pathways in human colonic *Bacteroides*. *Nature Microbiology*, 2018, 3(2): 210–219.
- [20] Munoz JM, Cartmell A, Terrapon N, Henrissat B, Gilbert HJ. Unusual active site location and catalytic apparatus in a glycoside hydrolase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(19): 4936–4941.
- [21] Cartmell A, Munoz JM, Briggs JA, Ndeh DA, Lowe EC, Baslé A, Terrapon N, Stott K, Heunis T, Gray J, Yu L, Dupree P, Fernandes PZ, Shah S, Williams SJ, Labourel A, Trost M, Henrissat B, Gilbert HJ. A surface endogalactanase in *Bacteroides thetaiotaomicron* confers keystone status for arabinogalactan degradation. *Nature Microbiology*, 2018, 3(11): 1314–1326.
- [22] Munoz JM, Cartmell A, Terrapon N, Baslé A, Henrissat B, Gilbert HJ. An evolutionarily distinct family of polysaccharide lyases removes rhamnose capping of complex arabinogalactan proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(32): 13271–13283.
- [23] Ndeh D, Munoz JM, Cartmell A, Bulmer D, Wills C, Henrissat B, Gray J. The human gut microbe *Bacteroides thetaiotaomicron* encodes the founding member of a novel glycosaminoglycan-degrading polysaccharide lyase family PL29. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293: 17906–17916.
- [24] Abe K, Nakajima M, Yamashita T, Matsunaga H, Kamisuki S, Nihira T, Takahashi Y, Sugimoto N, Miyanaga A, Nakai H, Arakawa T, Fushinobu S, Taguchi H. Biochemical and structural analyses of a bacterial endo- β -1,2-glucanase reveal a new glycoside hydrolase family. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(18): 7487–7506.
- [25] Little DJ, Pfoh R, Le Mauff F, Bamford NC, Notte C, Baker P, Guragain M, Robinson H, Pier GB, Nitz M, Deora R, Sheppard DC, Howell PL. PgaB orthologues contain a glycoside hydrolase domain that cleaves deacetylated poly- β (1,6)-N-acetylglucosamine and can disrupt bacterial biofilms. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(4): e1006998.
- [26] Kuhadomlarp S, Patron NJ, Henrissat B, Rejzek M, Saalbach G, Field RA. Identification of *Euglena*

- gracilis* β -1,3-glucan phosphorylase and establishment of a new glycoside hydrolase (GH) family GH149. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(8): 2865–2876.
- [27] Passow U. Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments. *Progress in Oceanography*, 2002, 55(3/4): 287–333.
- [28] Cho KH, Cho D, Wang GR, Salyers AA. New regulatory gene that contributes to control of *Bacteroides thetaiotaomicron* starch utilization genes. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(24): 7198–7205.
- [29] Bjursell MK, Martens EC, Gordon JI. Functional genomic and metabolic studies of the adaptations of a prominent adult human gut symbiont, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to the suckling period. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(47): 36269–36279.
- [30] Foley MH, Cockburn DW, Koropatkin NM. The Sus operon: a model system for starch uptake by the human gut *Bacteroidetes*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, 73(14): 2603–2617.
- [31] Grondin JM, Tamura K, Dejean G, Abbott DW, Brumer H. Polysaccharide utilization loci: fueling microbial communities. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(15): e00860-16.
- [32] Martens EC, Koropatkin NM, Smith TJ, Gordon JI. Complex glycan catabolism by the human gut microbiota: the *Bacteroidetes* Sus-like paradigm. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(37): 24673–24677.
- [33] Cameron EA, Kwiatkowski KJ, Lee BH, Hamaker BR, Koropatkin NM, Martens EC. Multifunctional nutrient-binding proteins adapt human symbiotic bacteria for glycan competition in the gut by separately promoting enhanced sensing and catalysis. *mBio*, 2014, 5(5): e01441–e01414.
- [34] Koropatkin N, Martens EC, Gordon JI, Smith TJ. Structure of a SusD homologue, BT1043, involved in mucin O-glycan utilization in a prominent human gut symbiont. *Biochemistry*, 2009, 48(7): 1532–1542.
- [35] Glenwright AJ, Pothula KR, Bhamidimarri SP, Chorev DS, Baslé A, Firbank SJ, Zheng HJ, Robinson CV, Winterhalter M, Kleinekathöfer U, Bolam DN, Van Den Berg B. Structural basis for nutrient acquisition by dominant members of the human gut microbiota. *Nature*, 2017, 541(7637): 407–411.
- [36] Larsbrink J, Rogers TE, Hemsworth GR, McKee LS, Tauzin AS, Spadiut O, Klinter S, Pudlo NA, Urs K, Koropatkin NM, Creagh AL, Haynes CA, Kelly AG, Cederholm SN, Davies GJ, Martens EC, Brumer H. A discrete genetic locus confers xyloglucan metabolism in select human gut *Bacteroidetes*. *Nature*, 2014, 506(7489): 498–502.
- [37] Cuskin F, Lowe EC, Temple MJ, Zhu YP, Cameron E, Pudlo NA, Porter NT, Urs K, Thompson AJ, Cartmell A, Rogowski A, Hamilton BS, Chen R, Tolbert TJ, Piens K, Bracke D, Verweken W, Hakki Z, Speciale G, Munõz-Munõz JL, Day A, Peña MJ, McLean R, Suits MD, Boraston AB, Atherly T, Ziemer CJ, Williams SJ, Davies GJ, Abbott DW, Martens EC, Gilbert HJ. Human gut *Bacteroidetes* can utilize yeast mannan through a selfish mechanism. *Nature*, 2015, 517(7533): 165–169.
- [38] D’Elia JN, Salyers AA. Effect of regulatory protein levels on utilization of starch by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(24): 7180–7186.
- [39] Lowe EC, Baslé A, Czjzek M, Firbank SJ, Bolam DN. A scissor blade-like closing mechanism implicated in transmembrane signaling in a *Bacteroides* hybrid two-component system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(19): 7298–7303.
- [40] McNulty NP, Wu M, Erickson AR, Pan CL, Erickson BK, Martens EC, Pudlo NA, Muegge BD, Henrissat B, Hettich RL, Gordon JI. Effects of diet on resource utilization by a model human gut microbiota containing *Bacteroides cellulosilyticus* WH2, a symbiont with an extensive glycobiome. *PLoS Biology*, 2013, 11(8): e1001637.
- [41] Schwalm ND III, Townsend GE II, Groisman EA. Multiple signals govern utilization of a polysaccharide in the gut bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron*. *mBio*, 2016, 7(5): e01342-16.
- [42] Helbert W. Marine polysaccharide sulfatases. *Frontiers in Marine Science*, 2017, 4: 6.
- [43] Davies GJ, Gloster TM, Henrissat B. Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*, 2005, 15(6): 637–645.
- [44] Reisky L, Büchsenschütz HC, Engel J, Song T, Schweder T, Hehemann JH, Bornscheuer UT. Oxidative demethylation of algal carbohydrates by cytochrome P450 monooxygenases. *Nature Chemical Biology*, 2018, 14(4): 342–344.
- [45] Bäumgen M, Dutschei T, Bornscheuer UT. Marine polysaccharides: occurrence, enzymatic degradation

- and utilization. *ChemBioChem*, 2021, 22(13): 2247–2256.
- [46] Hehemann JH, Truong LV, Unfried F, Welsch N, Kabisch J, Heiden SE, Junker S, Becher D, Thürmer A, Daniel R, Amann R, Schweder T. Aquatic adaptation of a laterally acquired pectin degradation pathway in marine gammaproteobacteria. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(6): 2320–2333.
- [47] Hehemann JH, Kelly AG, Pudlo NA, Martens EC, Boraston AB. Bacteria of the human gut microbiome catabolize red seaweed glycans with carbohydrate-active enzyme updates from extrinsic microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(48): 19786–19791.
- [48] Becker S, Scheffel A, Polz MF, Hehemann JH. Accurate quantification of laminarin in marine organic matter with enzymes from marine microbes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(9): e03389-16.
- [49] Kappelmann L, Krüger K, Hehemann JH, Harder J, Markert S, Unfried F, Becher D, Shapiro N, Schweder T, Amann RI, Teeling H. Polysaccharide utilization loci of North Sea *Flavobacteriia* as basis for using SusC/D-protein expression for predicting major phytoplankton glycans. *The ISME Journal*, 2019, 13(1): 76–91.
- [50] Wang LP, Chen YW, Huang H, Huang ZB, Chen H, Shao ZZ. Isolation and identification of *Vibrio campbellii* as a bacterial pathogen for luminous vibriosis of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 2015, 46(2): 395–404.
- [51] Gobet A, Barbeyron T, Matard-Mann M, Magdelenat G, Vallenet D, Duchaud E, Michel G. Evolutionary evidence of algal polysaccharide degradation acquisition by *Pseudoalteromonas carrageenovora* 9^T to adapt to macroalgal niches. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2740.
- [52] Ficko-Blean E, Préchoux A, Thomas F, Rochat T, Larocque R, Zhu YT, Stam M, Génicot S, Jam M, Calteau A, Viart B, Ropartz D, Pérez-Pascual D, Correc G, Matard-Mann M, Stubbs KA, Rogniaux H, Jeudy A, Barbeyron T, Médigue C, Czjzek M, Vallenet D, McBride MJ, Duchaud E, Michel G. Carrageenan catabolism is encoded by a complex regulon in marine heterotrophic bacteria. *Nature Communications*, 2017, 8: 1685.
- [53] Bonugli-Santos RC, Dos Santos Vasconcelos MR, Passarini MRZ, Vieira GAL, Lopes VCP, Mainardi PH, Dos Santos JA, De Azevedo Duarte L, Otero IVR, Da Silva Yoshida AM, Feitosa VA, Pessoa A, Sette LD. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 269.
- [54] Wang YM, Barth D, Tamminen A, Wiebe MG. Growth of marine fungi on polymeric substrates. *BMC Biotechnology*, 2016, 16: 3.
- [55] Balabanova L, Slepchenko L, Son O, Tekutyeva L. Biotechnology potential of marine fungi degrading plant and algae polymeric substrates. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1527.
- [56] Boedeker C, Schüler M, Reintjes G, Jeske O, Van Teeseling MCF, Jogler M, Rast P, Borchert D, Devos DP, Kucklick M, Schaffer M, Kolter R, Van Niftrik L, Engelmann S, Amann R, Rohde M, Engelhardt H, Jogler C. Determining the bacterial cell biology of *Planctomycetes*. *Nature Communications*, 2017, 8: 14853.
- [57] Reintjes G, Arnosti C, Fuchs BM, Amann R. An alternative polysaccharide uptake mechanism of marine bacteria. *The ISME Journal*, 2017, 11(7): 1640–1650.
- [58] Teske A, Durbin A, Ziervogel K, Cox C, Arnosti C. Microbial community composition and function in permanently cold Seawater and sediments from an arctic fjord of Svalbard. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(6): 2008–2018.
- [59] Sichert A, Corzett CH, Schechter MS, Unfried F, Markert S, Becher D, Fernandez-Guerra A, Liebecke M, Schweder T, Polz MF, Hehemann JH. *Verrucomicrobia* use hundreds of enzymes to digest the algal polysaccharide fucoidan. *Nature Microbiology*, 2020, 5(8): 1026–1039.
- [60] Neumann AM, Balmonte JP, Berger M, Giebel HA, Arnosti C, Voget S, Simon M, Brinkhoff T, Wietz M. Different utilization of alginate and other algal polysaccharides by marine *Alteromonas macleodii* ecotypes. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(10): 3857–3868.
- [61] Thomas F, Barbeyron T, Tonon T, Génicot S, Czjzek M, Michel G. Characterization of the first alginolytic operons in a marine bacterium: from their emergence in marine *Flavobacteriia* to their independent transfers to marine *Proteobacteria* and human gut *Bacteroides*.

- Environmental Microbiology*, 2012, 14(9): 2379–2394.
- [62] Unfried F, Becker S, Robb CS, Hehemann JH, Markert S, Heiden SE, Hinzke T, Becher D, Reintjes G, Krüger K, Avci B, Kappellmann L, Hahnke RL, Fischer T, Harder J, Teeling H, Fuchs B, Barbeyron T, Amann RI, Schweder T. Adaptive mechanisms that provide competitive advantages to marine *Bacteroidetes* during microalgal blooms. *The ISME Journal*, 2018, 12(12): 2894–2906.
- [63] Xing P, Hahnke RL, Unfried F, Markert S, Huang SX, Barbeyron T, Harder J, Becher D, Schweder T, Glöckner FO, Amann RI, Teeling H. Niches of two polysaccharide-degrading *Polaribacter* isolates from the North Sea during a spring diatom bloom. *The ISME Journal*, 2015, 9(6): 1410–1422.
- [64] Koch H, Dürwald A, Schweder T, Noriega-Ortega B, Vidal-Melgosa S, Hehemann JH, Dittmar T, Freese HM, Becher D, Simon M, Wietz M. Biphasic cellular adaptations and ecological implications of *Alteromonas macleodii* degrading a mixture of algal polysaccharides. *The ISME Journal*, 2019, 13(1): 92–103.
- [65] Arnosti C, Wietz M, Brinkhoff T, Hehemann JH, Probandt D, Zeugner L, Amann R. The biogeochemistry of marine polysaccharides: sources, inventories, and bacterial drivers of the carbohydrate cycle. *Annual Review of Marine Science*, 2021, 13: 81–108.
- [66] Baltar F, Arístegui J, Sintes E, Van Aken HM, Gasol JM, Herndl GJ. Prokaryotic extracellular enzymatic activity in relation to biomass production and respiration in the meso- and bathypelagic waters of the (sub)tropical Atlantic. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(8): 1998–2014.
- [67] Grossart HP, Hietanen S, Ploug H. Microbial dynamics on diatom aggregates in Øresund, Denmark. *Marine Ecology Progress Series*, 2003, 249: 69–78.
- [68] Smith DC, Simon M, Alldredge AL, Azam F. Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature*, 1992, 359(6391): 139–142.
- [69] Boetius A, Scheibej S, Tselepidis A, Thiel H. Microbial biomass and activities in deep-sea sediments of the Eastern Mediterranean: trenches are benthic hotspots. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 1996, 43(9): 1439–1460.
- [70] Arnosti C. A new method for measuring polysaccharide hydrolysis rates in marine environments. *Organic Geochemistry*, 1996, 25(1/2): 105–115.
- [71] Arnosti C. Fluorescent derivatization of polysaccharides and carbohydrate-containing biopolymers for measurement of enzyme activities in complex media. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2003, 793(1): 181–191.
- [72] Balmonte JP, Teske A, Arnosti C. Structure and function of high Arctic pelagic, particle-associated and benthic bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(8): 2941–2954.
- [73] Hoarfrost A, Arnosti C. Heterotrophic extracellular enzymatic activities in the Atlantic ocean follow patterns across spatial and depth regimes. *Frontiers in Marine Science*, 2017, 4: 200.
- [74] Steen AD, Ziervogel K, Ghobrial S, Arnosti C. Functional variation among polysaccharide-hydrolyzing microbial communities in the Gulf of Mexico. *Marine Chemistry*, 2012, 138: 13–20.
- [75] D’Ambrosio L, Ziervogel K, MacGregor B, Teske A, Arnosti C. Composition and enzymatic function of particle-associated and free-living bacteria: a coastal/offshore comparison. *The ISME Journal*, 2014, 8(11): 2167–2179.
- [76] Steen AD, Hamdan LJ, Arnosti C. Dynamics of dissolved carbohydrates in the Chesapeake Bay: insights from enzyme activities, concentrations, and microbial metabolism. *Limnology and Oceanography*, 2008, 53(3): 936–947.
- [77] Ziervogel K, Steen AD, Arnosti C. Changes in the spectrum and rates of extracellular enzyme activities in seawater following aggregate formation. *Biogeosciences*, 2010, 7(3): 1007–1015.
- [78] Jatt AN, Tang KH, Liu JW, Zhang ZH, Zhang XH. Quorum sensing in marine snow and its possible influence on production of extracellular hydrolytic enzymes in marine snow bacterium *Pantoea ananatis* B9. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, 91(2): 1–13.
- [79] Drescher K, Nadell CD, Stone HA, Wingreen NS, Bassler BL. Solutions to the public goods dilemma in bacterial biofilms. *Current Biology*, 2014, 24(1): 50–55.
- [80] Traving SJ, Thygesen UH, Riemann L, Stedmon CA. A model of extracellular enzymes in free-living microbes: which strategy pays off? *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(21): 7385–7393.

- [81] Allison SD. Cheaters, diffusion and nutrients constrain decomposition by microbial enzymes in spatially structured environments. *Ecology Letters*, 2005, 8(6): 626–635.
- [82] Hehemann JH, Arevalo P, Datta MS, Yu XQ, Corzett CH, Henschel A, Preheim SP, Timberlake S, Alm EJ, Polz MF. Adaptive radiation by waves of gene transfer leads to fine-scale resource partitioning in marine microbes. *Nature Communications*, 2016, 7: 12860.
- [83] Arnosti C, Reintjes G, Amann R. A mechanistic microbial underpinning for the size-reactivity continuum of dissolved organic carbon degradation. *Marine Chemistry*, 2018, 206: 93–99.
- [84] Reintjes G, Fuchs BM, Scharfe M, Wiltshire KH, Amann R, Arnosti C. Short-term changes in polysaccharide utilization mechanisms of marine bacterioplankton during a spring phytoplankton bloom. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(5): 1884–1900.
- [85] Polz MF, Hunt DE, Preheim SP, Weinreich DM. Patterns and mechanisms of genetic and phenotypic differentiation in marine microbes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2006, 361(1475): 2009–2021.
- [86] Krüger K, Chafee M, Ben Francis T, Glavina Del Rio T, Becher D, Schweder T, Amann RI, Teeling H. In marine *Bacteroidetes* the bulk of glycan degradation during algae blooms is mediated by few clades using a restricted set of genes. *The ISME Journal*, 2019, 13(11): 2800–2816.
- [87] Zimmerman AE, Martiny AC, Allison SD. Microdiversity of extracellular enzyme genes among sequenced prokaryotic genomes. *The ISME Journal*, 2013, 7(6): 1187–1199.
- [88] Wietz M, Wemheuer B, Simon H, Giebel HA, Seibt MA, Daniel R, Brinkhoff T, Simon M. Bacterial community dynamics during polysaccharide degradation at contrasting sites in the Southern and Atlantic Oceans. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(10): 3822–3831.
- [89] Lauro FM, McDougald D, Thomas T, Williams TJ, Egan S, Rice S, DeMaere MZ, Ting L, Ertan H, Johnson J, Ferriera S, Lapidus A, Anderson I, Kyrpides N, Munk AC, Detter C, Han CS, Brown MV, Robb FT, Kjelleberg S, Cavicchioli R. The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(37): 15527–15533.
- [90] Vetter YA, Deming JW, Jumars PA, Krieger-Brockett BB. A predictive model of bacterial foraging by means of freely released extracellular enzymes. *Microbial Ecology*, 1998, 36(1): 75–92.
- [91] Avcı B, Krüger K, Fuchs BM, Teeling H, Amann RI. Polysaccharide niche partitioning of distinct *Polaribacter* clades during North Sea spring algal blooms. *The ISME Journal*, 2020, 14(6): 1369–1383.
- [92] Zhou J, Zhang BY, Yu K, Du XP, Zhu JM, Zeng YH, Cai ZH. Functional profiles of phycospheric microorganisms during a marine dinoflagellate bloom. *Water Research*, 2020, 173: 115554.
- [93] Moller I, Sørensen I, Bernal AJ, Blaukopf C, Lee K, Øbro J, Pettolino F, Roberts A, Mikkelsen JD, Knox JP, Bacic A, Willats WGT. High-throughput mapping of cell-wall polymers within and between plants using novel microarrays. *The Plant Journal*, 2007, 50(6): 1118–1128.
- [94] Hervé C, Siméon A, Jam M, Cassin A, Johnson KL, Salmeán AA, Willats WGT, Doblin MS, Bacic A, Kloareg B. Arabinogalactan proteins have deep roots in eukaryotes: identification of genes and epitopes in brown algae and their role in *Fucus serratus* embryo development. *The New Phytologist*, 2016, 209(4): 1428–1441.
- [95] Salmeán AA, Guillouzo A, Duffieux D, Jam M, Matard-Mann M, Larocque R, Pedersen HL, Michel G, Czjzek M, Willats WGT, Hervé C. Double blind microarray-based polysaccharide profiling enables parallel identification of uncharacterized polysaccharides and carbohydrate-binding proteins with unknown specificities. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1–11.
- [96] Koch H, Freese HM, Hahnke RL, Simon M, Wietz M. Adaptations of *Alteromonas* sp. 76-1 to polysaccharide degradation: a CAZyme plasmid for ulvan degradation and two alginolytic systems. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 504.
- [97] Yamahara KM, Preston CM, Birch J, Walz K, Marin R III, Jensen S, Pargett D, Roman B, Ussler W III, Zhang YW, Ryan J, Hobson B, Kieft B, Raanan B, Goodwin KD, Chavez FP, Scholin C. *In situ* autonomous acquisition and preservation of marine environmental DNA using an autonomous underwater vehicle. *Frontiers in Marine Science*, 2019, 6: 373.
- [98] Koch H, Germscheid N, Freese HM, Noriega-Ortega B, Lücking D, Berger M, Qiu G, Marzinelli EM, Campbell

- AH, Steinberg PD, Overmann J, Dittmar T, Simon M, Wietz M. Genomic, metabolic and phenotypic variability shapes ecological differentiation and intraspecies interactions of *Alteromonas macleodii*. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 809.
- [99] Foran E, Buravenkov V, Kopel M, Mizrahi N, Shoshani S, Helbert W, Banin E. Functional characterization of a novel “ulvan utilization loci” found in *Alteromonas* sp. LOR genome. *Algal Research*, 2017, 25: 39–46.
- [100] Saw JHW, Nunoura T, Hirai M, Takaki Y, Parsons RJ, Michelsen M, Longnecker K, Kujawinski EB, Stepanauskas R, Landry Z, Carlson CA, Giovannoni SJ. Pangenomics analysis reveals diversification of enzyme families and niche specialization in globally abundant SAR202 bacteria. *mBio*, 2020, 11(1): e02975-19.
- [101] Bird JT, Tague ED, Zinke L, Schmidt JM, Steen AD, Reese B, Marshall IPG, Webster G, Weightman A, Castro HF, Campagna SR, Lloyd KG. Uncultured microbial phyla suggest mechanisms for multi-thousand-year subsistence in Baltic Sea sediments. *mBio*, 2019, 10(2): e02376-18.
- [102] Lazar CS, Baker BJ, Seitz K, Hyde AS, Dick GJ, Hinrichs KU, Teske AP. Genomic evidence for distinct carbon substrate preferences and ecological niches of *Bathyarchaeota* in estuarine sediments. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(4): 1200–1211.
- [103] Orsi WD, Richards TA, Francis WR. Predicted microbial secretomes and their target substrates in marine sediment. *Nature Microbiology*, 2018, 3(1): 32–37.
- [104] Hehemann JH, Correc G, Thomas F, Bernard T, Barbeyron T, Jam M, Helbert W, Michel G, Czjzek M. Biochemical and structural characterization of the complex agarolytic enzyme system from the marine bacterium *Zobellia galactanivorans*. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(36): 30571–30584.
- [105] Rebuffet E, Groisillier A, Thompson A, Jeudy A, Barbeyron T, Czjzek M, Michel G. Discovery and structural characterization of a novel glycosidase family of marine origin. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(5): 1253–1270.
- [106] Enke TN, Leventhal GE, Metzger M, Saavedra JT, Cordero OX. Microscale ecology regulates particulate organic matter turnover in model marine microbial communities. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2743.

(本文责编 李磊)