张文彬, 王藤, 施金豆, 等. 发酵粘液乳杆菌 A51 胞外多糖翻转酶的结构性质及功能特性分析 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(8): 202−211. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030287
ZHANG Wenbin, WANG Teng, SHI Jindou, et al. Analysis of the Structural Properties and Functional Mechanism of the Extracellular Polysaccharide Flippase of *Limosilactobacillus fermentum* A51[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(8): 202−211. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030287

·生物工程·

# 发酵粘液乳杆菌 A51 胞外多糖翻转酶的结构性质及功能特性分析

张文彬, 王　藤, 施金豆, 王玉珠, 魏光强*, 黄艾祥*
（云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650201）

**摘　要:** 为了探讨发酵粘液乳杆菌 A51 胞外多糖翻转酶（polysaccharide flippase，Wzx）的结构性质和功能特性，本文综合运用生物信息学技术对 Wzx 蛋白展开系统研究，首先通过多序列比对和系统发育树构建分析其进化特征，随后对其理化性质、亚细胞定位、功能域、亲/疏水特性、信号肽、跨膜区域、磷酸化修饰位点、糖基化修饰位点、高级结构以及作用方式进行预测分析。结果表明，Wzx 由 472 个氨基酸编码，分子量为 53.31 kDa，原子总数为 7651，理论等电点 9.50，不稳定系数 33.79，为碱性稳定疏水蛋白。Wzx 无信号肽，在细胞膜上发挥翻转酶作用；经过跨膜域预测，发现存在 14 个跨膜螺旋结构；存在 33 个显著性磷酸化修饰位点，其中包含 14 个丝氨酸（Ser）位点、12 个苏氨酸（Thr）位点以及 7 个酪氨酸（Tyr）位点；亚细胞定位及功能域预测中，Wzx 主要定位在内质网（55.6%）上，属 Multidrug and Toxic Compound Extrusion family。Wzx 的二级结构中 $\alpha$-螺旋占 61.44%、无规则卷曲占 22.25%、延伸链占 16.31%，根据 Wzx 的三维结构呈“V”状，推测其通过自身构象翻转或者是自身构象的改变从而实现对胞外多糖的转运。本研究为深入理解 Wzx 的功能特性及作用方式提供理论依据，对理解胞外多糖的转运具有重要意义。

**关键词:** 胞外多糖, 翻转酶, 结构性质, 功能特性, 生物信息学
**中图分类号:** TS201.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)08−0202−10
**DOI:** 10.13386/j.issn1002-0306.2025030287
本文网刊:

# Analysis of the Structural Properties and Functional Mechanism of the Extracellular Polysaccharide Flippase of *Limosilactobacillus fermentum* A51

**ZHANG Wenbin, WANG Teng, SHI Jindou, WANG Yuzhu, WEI Guangqiang*, HUANG Aixiang***
（College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China）

**Abstract:** In order to explore the structural and functional properties of the extracellular polysaccharide flippase (Wzx) from *Lactobacillus fermentum* A51, this paper systematically investigated the Wzx protein using bioinformatics technology. Firstly, the evolutionary characteristics of the Wzx protein were analyzed through multiple sequence alignment and the construction of a phylogenetic tree. Subsequently, the physicochemical properties, subcellular localization, functional domains, hydrophilicity/hydrophobicity, signal peptides, transmembrane regions, phosphorylation modification sites, glycosylation modification sites, advanced structure, and mode of action were predicted and analyzed. The results indicated that Wzx was composed of 472 amino acids, with a relative molecular weight of 53.31 kDa and a total atom count of 7651. The theoretical isoelectric point was 9.50, and the instability coefficient was 33.79, and it was an alkaline stable

**收稿日期:** 2025−03−21
**基金项目:** 云南省教育厅科学研究基金项目（2025J0360）; 国家自然科学基金地区科学基金项目（32260578）。
**作者简介:** 张文彬（2001−）（ORCID: 0009−0001−1277−4412）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: 934079253@qq.com。
*** 通信作者:** 魏光强（1995−）（ORCID: 0000−0001−6930−1002）, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 益生菌资源与乳品科学, E-mail: 1134131384@qq.com。
黄艾祥（1963−）（ORCID: 0000−0003−4148−8455）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食物新资源开发与乳品科学, E-mail: aixianghuang@126.com。

hydrophobic protein. Wzx lacked a signal peptide and functioned as a flipping enzyme within the cell membrane. Following transmembrane domain prediction, it was determined that Wzx contained 14 transmembrane helix structures. A total of 33 significant phosphorylation sites were identified, comprising 14 serine (Ser) sites, 12 threonine (Thr) sites, and 7 tyrosine (Tyr) sites. Regarding subcellular localization and functional domain prediction, Wzx was predominantly localized in the endoplasmic reticulum (55.6%), indicating its membership in the Multidrug and Toxic Compound Extrusion family. In terms of the secondary structure of Wzx, $\alpha$-helix constituted 61.44%, random coil accounted for 22.25%, and extended chain represented 16.31%, Based on the "V" shape of the three-dimensional structure of Wzx, it was speculated that it realized the transport of extracellular polysaccharides through its own conformational reversal or its own conformational change. This study offers a theoretical foundation for a deeper understanding of the functional characteristics and mechanisms of action of Wzx, which is crucial for comprehending the transport processes of extracellular polysaccharides.

**Key words:** extracellular polysaccharides; flippase; structural properties; functional features; bioinformatics

胞外多糖(Extracellular Polysaccharide, EPS)是指以碳源为基础[1], 经过一系列酶促化学反应在细胞内产生并分泌到细胞壁外的高分子聚合物, 属于微生物次生代谢的产物[2], 是生物膜的重要组成部分[3]。胞外多糖因其独特的物理化学性质及生物活性, 在食品工业中作为增稠剂、稳定剂和凝胶剂使用, 用于改善食品的质地和口感[4]。

微生物合成胞外多糖主要通过四种途径: 胞外合成、ABC 转运体依赖、合酶依赖以及 Wzx/Wzy 依赖[5]。其中, Wzx/Wzy 依赖途径在乳酸菌中尤为常见, 它涉及到多糖链的合成与翻转, 以及多糖与脂质载体的连接和转运过程[6]。Wzx/Wzy 依赖途径具有独立的重复单元组装过程, 合成途径大致分为五个主要步骤: a.单糖/双糖的转运及磷酸化; b.糖核苷酸形成; c.重复单元合成; d.重复单元由细胞膜内表面转运至膜外; e.重复单元聚合, 长链释放[7]。Wzx 在此过程中作为一种重要的翻转酶, 主要负责将多糖重复单元从细胞内膜翻转至细胞外膜(图 1), Wzx 的这一功能特性使其成为研究胞外多糖合成和转运机制的重要靶点。了解 Wzx 的结构性质和作用方式, 对于理解胞外多糖的生物合成机制、探索其在细菌生物学中的作用等具有重要意义。

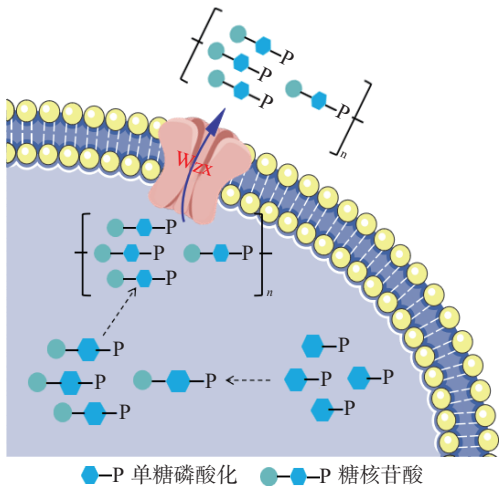



图 1　Wzx 在胞外多糖转运过程中的作用示意图

Fig.1　Schematic diagram of the role of Wzx in the process of extracellular polysaccharide transport

课题组前期从牦牛酸奶中分离鉴定的 *Limosilactobacillus fermentum* A51(*L. fermentum* A51)表现出较高 EPS 合成能力, 并被用于改善酸奶的质地和口感[8]。随后通过全基因组测序分析揭示了 *L. fermentum* A51 含有 EPS 合成相关基因(*glf*, *epsG*, *gtf*, *Wzz*, *Wzx*, *Wzy*), 并确定其胞外多糖合成路径为 Wzx/Wzy 依赖型。蛋白质组学分析进一步确认了 Wzx 在 *L. fermentum* A51 的胞外多糖合成中起着至关重要的作用, 尤其是在多糖的翻转过程中扮演了核心角色。

为进一步了解 Wzx 在 *L. fermentum* A51 胞外多糖转运中的结构性质和功能特性, 本研究通过综合利用生物信息学技术, 通过多序列比对和系统发育树构建解析其进化关系, 并对其理化性质、亚细胞定位、功能域、亲疏水性、信号肽、跨膜区域、磷酸化修饰位点、糖基化修饰位点、高级结构以及作用方式进行预测与分析, 从而确定 Wzx 在 *L. fermentum* A51 胞外多糖合成路径中的关键作用, 为深入理解 Wzx 在胞外多糖生物合成及转运中的作用机制提供理论依据。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

发酵粘液乳杆菌 A51　从香格里拉自然发酵的牦牛奶中提取, 已完成形态学与分子生物学层面的鉴定, 保存于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为 CCTCC(NO: M 2023861)。该菌株作为主要研究对象, 用于后续的生物信息学分析。利用 Illumina 平台和 PacBio 平台对 A51 菌株进行全基因组测序分析, 登录序列号: CP132542, 相关基因组序列已上传至 NCBI 数据库。

### 1.2　实验方法

1.2.1　Wzx 的多序列比对和系统发育树构建　将测序得到的 Wzx 核酸序列翻译成氨基酸序列, 在 NCBI 蛋白质数据库中检索其他来源的 Wzx 序列。利用 ESPript 3.0( https://espript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi)对不同种菌株的 Wzx 进行多重序列比对。利用 NCBI 的 BLAST 功能分析 Wzx 序列,

并用 MEGA 11 软件构建系统发育树。Bootstrap 分析的迭代次数设置为 1000, 以确保系统发育树拓扑结构的可靠性。

1.2.2 Wzx 的理化性质分析 Wzx 的氨基酸序列如表 1 所示。利用生物信息学方法对 Wzx 的结构和功能进行分析。

采用 ExPASy 平台的 ProtParam 在线分析工具(https://web.expasy.org/protparam/)对 Wzx 的理化特性进行表征, 包括: 分子式、分子量、原子总数、脂肪族指数、不稳定性指数(II)、半衰期、亲水性总平均值(grand average of hydropathicity, GRAVY)、理论等电点值、带负电荷的残基总数(Asp+Glu)、带正电荷的残基总数(Arg+Lys)等。

1.2.3 Wzx 的亚细胞定位及功能域分析 通过 NCBI 数据库中的 Consered Domains(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)对 Wzx 的功能结构域进行预测, 使用 PSORTII 在线分析软件(https://www.genscript.com/psort.html)对 Wzx 的亚细胞定位进行预测。

1.2.4 Wzx 的亲/疏水区域、信号肽及蛋白质跨膜区域分析 综合运用生物信息学在线工具对 Wzx 蛋白的亲/疏水区域、信号肽及蛋白质跨膜区域进行分析。通过 ProtScale(https://web.expasy.org/protscale/)对 Wzx 蛋白的亲疏水性进行分析; 利用 SignalP-6.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)对 Wzx 蛋白的信号肽进行预测; 通过 TMHMM Server v. 2.0 对 Wzx 蛋白的跨膜区域进行预测。

1.2.5 Wzx 的磷酸化位点和糖基化位点分析 采用生物信息学方法分析 Wzx 的翻译后修饰位点: 分别利用 NetPhos3.1 Server(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/)和 NetNGlyc 1.0(https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/)对 Wzx 的磷酸化位点和 N-糖基化位点进行分析预测。

1.2.6 Wzx 的高级结构预测分析 采用生物信息学工具对 Wzx 蛋白的空间结构进行预测分析: 通过 SOPMA 在线服务器(https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)对其二级结构进行预测; 通过 SWISS-MODEL 同源建模平台(https://swissmodel.Expasy.org)构建三级结构模型, 并通过 Saves v6.0 在线评估系统(https://saves.mbi.ucla.edu/)对三级结构模型的质量进行验证和评估。

## 2 结果与分析

### 2.1 Wzx 的多序列比对和进化关系分析

通过 NCBI 数据库检索获得与发酵粘液乳杆菌 A51 的 Wzx 同源性较高的菌株的 Wzx 氨基酸序列进行多序列比对分析, 结果如图 2 所示。从比对结果中可知 Wzx 在不同菌株间存在高度保守的氨基酸序列区域, 并且其进化历程相对独立, 未受到明显的水平基因转移事件的影响。这些保守区域可能对维持 Wzx 的功能至关重要。通过 Clustal Omega 算法, 进一步分析了这些序列的相似性, 发现关键功能位点在不同物种间保持了一致性。



图 2 不同物种 Wzx 多序列比对结果

Fig.2 Multiple sequence alignment results of Wzx in different species

基于 Wzx 氨基酸序列的同源性分析结果, 利用 MEGA 11 构建 Wzx 的系统进化树, 如图 3 所示。由图 3 可知, 在系统进化树中, Wzx 被清晰地分为几个主要的进化分支, 这些分支与不同物种的分类相一

表 1 Wzx 的氨基酸序列

Table 1 Amino acid sequence of Wzx

| 蛋白 | 蛋白编码氨基酸序列 |
|---|---|
| Wzx | MKVIRNYLYNAGYQILLMIAPLVTTPYVSRALGAHASGINTYTNGWVTVFYLVGQMGIGLYGNREVAYHRDDKRERSRIFWGIEALQLCTISISLVAYLVAVFLFSTTFREYYLLQTLWIVACGIDVSWYFMGMEDFKKTVVRNTIVKLIMIVLIFTLVKTEADLWKYILLIGVAQLSGNLTLWPYLKSNIQWVSPKEWHPLRHLYPSLLLFIPTITTQIYLVVNKLMLGKIGQPTALGQFDYADRLVKLVLAIVTATGTVMLPHIANKFAKGDLKGVRESLYNSFDFVTAMAVPMMFGLMAISEKFAPWFLGNGYQDAGKIIFFEAPAIVFIAWSNVTGDQYLMPIDRVKEYTVSVSIGAVVNVIANILLIPFYSANGAALATVIAEFSVMAVQMNFVRSTIRRRQLFRSSWRYFLGGLVMFLVVNRICDVMTMNIVNMAIQIFVGTVIYVACLFILKAPVIEQAKQVLGK |

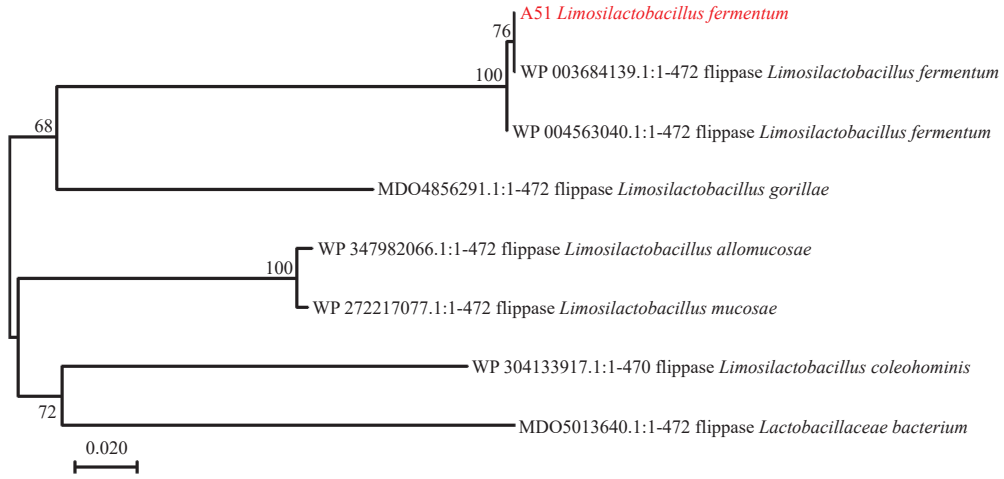



图 3　Wzx 系统进化树分析

Fig.3　Phylogenetic tree analysis of Wzx

致。通过深入分析发现 Wzx 在进化树上呈现出较为紧密的亲缘关系，表明 A51 菌株的 Wzx 和与其同源性较高菌株的 Wzx 之间在功能上具有相似性。进化树分析揭示了 Wzx 与其他相关蛋白的进化关系，表明 Wzx 可能属于一个古老的蛋白家族，且在进化过程中保持了其结构和功能的稳定性。图中分支长度反映了蛋白间的进化距离，短分支表明亲缘关系较近，而长分支则暗示了较远的进化距离。综上所述，多序列比对和进化关系分析不仅揭示了 Wzx 的进化历程，支持了 Wzx 在胞外多糖翻转过程中的关键作用，还为其结构和功能的深入研究奠定了基础。

## 2.2　Wzx 的理化性质

Wzx 作为一种关键的翻转酶，在发酵粘液乳杆菌 A51 中扮演着重要角色。其理化性质的分析对于理解其功能及作用机制至关重要。利用 ProtParam 工具对 Wzx 的理化参数及氨基酸组成进行了系统分析，理化参数详见表 2、氨基酸组成详见表 3。结果表明，Wzx 是由 472 个氨基酸编码的蛋白质，分子式为 $C_{2493}H_{3890}N_{610}O_{635}S_{23}$，分子量为 53.31 kDa，原子总数为 7651；理论等电点 pI 为 9.50，高于 7.0，表明该蛋白在生理 pH（约 7.4）下带正电荷，属于碱性蛋白；带正电荷的残基数（Arg+Lys）为 41 个，带负电荷的残基数（Asp+Glu）为 26 个，正电荷残基多于负电荷残基，进一步支持其为碱性蛋白；该蛋白在大肠杆菌表达系统中的半衰期>10 h，不稳定指数为 33.79，低于 40 的稳定性阈值，说明 Wzx 稳定性较好；脂肪族指数为 118.09，说明 Wzx 具有较高的热稳定性。总平均亲水性是用于衡量蛋白质整体亲水性或疏水性的指标。GRAVY 值为正表明蛋白质整体偏向疏水性，GRAVY 值为负表明蛋白质整体偏向亲水性。Wzx 总平均亲水性为 0.584，表明 Wzx 属于疏水性蛋白，这可能与其在细胞膜上的翻转酶活性功能有关。研究表明，Wzx 是一种多跨膜结构域蛋白，其序列多样性极为显著，可以以不同程度的偏好翻转寡糖底物[9]。了解 Wzx 的疏水性对于进一步解析其在细胞中的功能和作用机制具有重要意义。

表 2　Wzx 的理化性质

Table 2　Physical and chemical properties of Wzx

| 理化性质 | Wzx | 理化性质 | Wzx |
|---|---|---|---|
| 氨基酸数目 | 472 | 总平均亲水性（GRAVY） | 0.584 |
| 分子式 | $C_{2493}H_{3890}N_{610}O_{635}S_{23}$ | 不稳定指数 | 33.79 |
| 分子量（Da） | 53305.40 | 脂肪族指数 | 118.09 |
| 原子总数 | 7651 | 带正电荷氨基酸数量比例（%） | 41 |
| 等电点pI | 9.50 | 带负电荷氨基酸数量比例（%） | 26 |
| 半衰期（大肠杆菌）（h） | >10 | | |

表 3　Wzx 的氨基酸组成与含量

Table 3　Amino acid composition and content of Wzx

| 氨基酸 | 数量 | 占比（%） | 氨基酸 | 数量 | 占比（%） |
|---|---|---|---|---|---|
| 半胱氨酸 Cys（C） | 4 | 0.8 | 缬氨酸 Val（V） | 50 | 10.6 |
| 天冬酰胺 Asn（N） | 20 | 4.2 | 色氨酸 Trp（W） | 11 | 2.3 |
| 谷氨酰胺 Gln（Q） | 16 | 3.4 | 赖氨酸 Lys（K） | 21 | 4.4 |
| 丝氨酸 Ser（S） | 22 | 4.7 | 精氨酸 Arg（R） | 20 | 4.2 |
| 苏氨酸 Thr（T） | 28 | 5.9 | 天冬氨酸 Asp（D） | 13 | 2.8 |
| 酪氨酸 Tyr（Y） | 24 | 5.1 | 谷氨酸 Glu（E） | 13 | 2.8 |
| 丙氨酸 Ala（A） | 38 | 8.1 | 甘氨酸 Gly（G） | 30 | 6.4 |
| 苯丙氨酸 Phe（F） | 27 | 5.7 | 组氨酸 His（H） | 5 | 1.1 |
| 异亮氨酸 Ile（I） | 43 | 9.1 | 蛋氨酸 Met（M） | 19 | 4.0 |
| 亮氨酸 Leu（L） | 53 | 11.2 | 脯氨酸 Pro（P） | 15 | 3.2 |

Wzx 的氨基酸组成分析结果表明，极性氨基酸（C、N、Q、S、T、Y）共含有 114 个，占比约 24.1%；疏水性氨基酸（A、F、I、L、V、W）222 个，占比约 47%；强碱性氨基酸（K、R）和强酸性氨基酸（D、E）分别占比约 8.6%（41 个）和 5.6%（26 个）。疏水性氨基酸是膜蛋白的典型特征，高比例的疏水性氨基酸表明 Wzx 蛋白可能具有跨膜结构域或与膜结合的能力。此外，Wzx 还含有一定数量的甘氨酸（G）和脯氨酸（P），它们在蛋白质的结构和功能中发挥着重要作用。甘氨酸因其侧链较小，有助于增加蛋白质的柔性

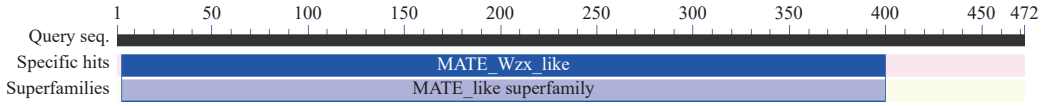



图 4 Wzx 的功能域

Fig.4 Functional domains of Wzx

和促进转角结构的形成，而脯氨酸则因其独特的环状结构，对蛋白质的折叠和稳定性具有重要影响[10]。氨基酸的不同组合和分布，共同决定了 Wzx 的溶解性、等电点、热稳定性等理化特性，从而影响了其作为翻转酶在生物体内的功能和作用方式。

### 2.3 Wzx 的亚细胞定位及功能域分析

PSORTII 在线预测结果显示，Wzx 主要定位在内质网（55.6%），其次可能为线粒体 22.2%，小概率分布在分泌系统的囊泡和细胞核，占比分别为 11.1% 和 11.1%，这一预测结果说明 Wzx 最有可能是内质网蛋白并在内质网中进行折叠和组装等过程。进一步的功能域分析显示，Wzx 包含多个保守的结构域，其中，最显著的结构域是位于 N 端的糖基转移酶结构域[11]，该结构域是 Wzx 执行其糖基转移酶功能的关键区域，负责催化多糖链的合成和翻转。

Wzx 已在革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌以及古细菌中被鉴定出来，并被归类为多糖转运蛋白（Polysaccharide Transport Protein，PST）家族的一部分，被认为起着翻转酶的作用[12]。通过 Conserved Domain 数据库分析可知 Wzx 属于 Multidrug and Toxic Compound Extrusion family（MATE）的一个亚家族，如图 4 所示，MATE 家族的蛋白质参与代谢物的跨膜转运，通常是导致多药耐药性（Multidrug Resistance，MDR）的原因[13]。通过对这些功能域的分析，可以更准确地预测 Wzx 的生物学功能，并为其在发酵粘液乳杆菌 A51 胞外多糖转运中的具体作用机制提供理论依据。

### 2.4 Wzx 的亲疏水区域、信号肽及蛋白质跨膜域分析

2.4.1 Wzx 的亲疏水性 亲疏水性是蛋白质的一个重要物理化学性质，它决定了蛋白质与其他分子的相互作用方式，以及蛋白质在生物体内的功能和稳定性[14]。采用 ProtScale 工具对 Wzx 进行亲/疏水性预测，确定各氨基酸残基的亲/疏水值分布特征及其在序列中的具体位置。

在蛋白质亲水性分析图谱中，负值区域表征亲水性，正值区域反映疏水性。分析结果显示（图 5），Wzx 蛋白在第 152 和 153 位氨基酸（异亮氨酸 Ile、缬氨酸 Val）处呈现最强疏水性，其最大值为 3.256；而第 73 位氨基酸（赖氨酸 Lys）表现出最强的亲水特性，其最大值为-3.689。整体分析结果表明，Wzx 的氨基酸序列中多数氨基酸呈现正值分布，表明其疏水区域显著多于亲水区域，这一特征与总平均亲水性指数 0.584 的测定结果相一致，表明该蛋白属于疏水性蛋白。这一特性可能与 Wzx 在细胞膜上的定位和功能有关[15]。进一步分析发现，Wzx 的亲疏水区域在序列上呈现出特定的模式，这可能与蛋白质的空间结构和功能域分布有关。观察图谱发现，Wzx 的亲水性区域主要分布在其 N 端和 C 端部分，而疏水性区域则相对集中在其序列中部。这种分布模式可能与 Wzx 的生物学功能及其与其他分子的相互作用有关。例如，疏水核心区域可能参与蛋白质的稳定折叠、跨膜转运或与其他疏水性分子的相互作用[16]。而亲水性区域则可能涉及与水分子的相互作用、酶催化活性位点的形成或与亲水性配体的结合。Wzx 的亲疏水性分析揭示了 Wzx 作为疏水性蛋白与细胞膜或细胞器的膜结构紧密结合，参与多种生物学过程，如物质转运、信号传导和细胞识别等，为深入理解 Wzx 在胞外多糖翻转过程中的作用方式提供了重要依据。

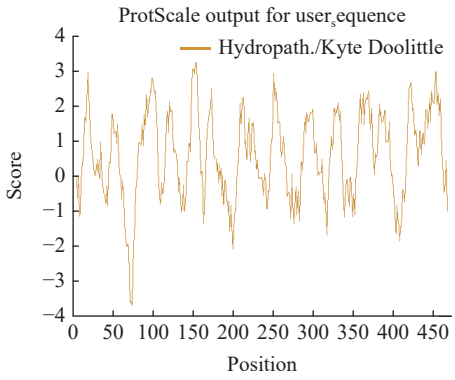



图 5 Wzx 的亲水性及疏水性

Fig.5 Hydrophilicity and hydrophobicity of Wzx

2.4.2 Wzx 的信号肽分析 信号肽是引导蛋白质进入内质网进行进一步加工的短肽序列[17]。通过对 Wzx 的信号肽进行分析，可以预测其可能的转运路径和定位。利用 SignalP-6.0 信号肽预测软件进行信号肽分析，如图 6 所示，结果表明，Wzx 不存在明显的信号肽序列。这意味着 Wzx 可能不通过典型的内质网-高尔基体途径进行分泌。这进一步支持了 Wzx 作为翻转酶在细胞膜上发挥作用，参与胞外多糖的合成与转运过程，而不依赖于传统的信号肽介导的分泌路径。这一发现对于理解 Wzx 的功能机制及其在细菌胞外多糖合成中的作用具有重要意义。

2.4.3 Wzx 的蛋白质跨膜域 为深入理解 Wzx 的转运和定位机制，进一步分析了其蛋白质跨膜域。跨膜域是蛋白质中能够穿越细胞膜的区域，通常与蛋白质的膜定位和功能紧密相关[18]。通过 TMHMM Sever v. 2.0 跨膜域软件对 Wzx 进行跨膜区域预测，

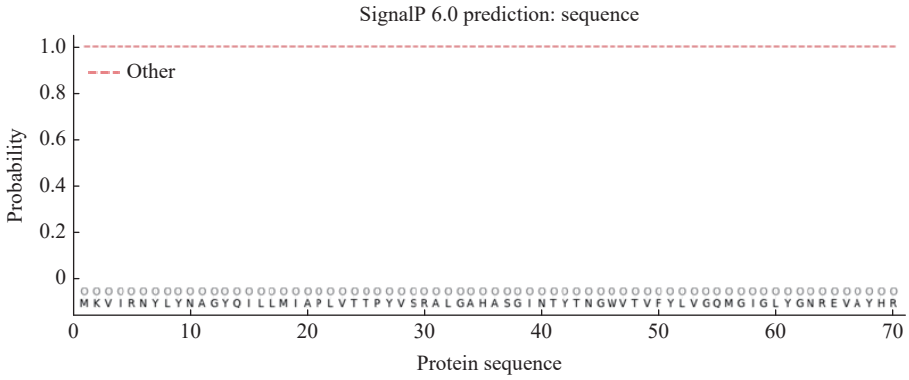



图 6　翻转酶 Wzx 的信号肽预测

Fig.6　Prediction of the signal peptide of Wzx

结果如图 7 所示。由图 7 可知，Wzx 中存在 14 个跨膜螺旋结构，这些跨膜螺旋结构均匀地分布在蛋白质序列中，暗示了 Wzx 与细胞膜的紧密结合。跨膜螺旋作为蛋白质与膜相互作用的关键结构，对于 Wzx 在细胞膜上的定位和功能发挥起着决定性作用[19]。此外，跨膜螺旋的数量和分布也进一步支持了 Wzx 作为翻转酶的可能性，表明其在胞外多糖合成与转运过程中可能通过穿越细胞膜来实现多糖的翻转和转运。这一发现为深入理解 Wzx 的转运机制及其在细菌胞外多糖合成中的作用提供了理论依据。

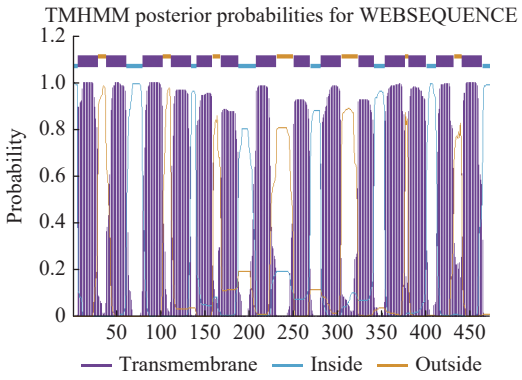



图 7　Wzx 跨膜结构

Fig.7　Transmembrane structure of Wzx



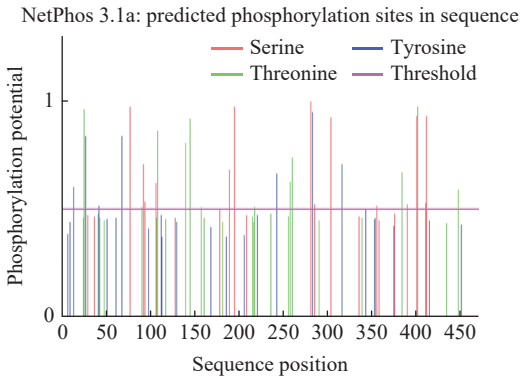



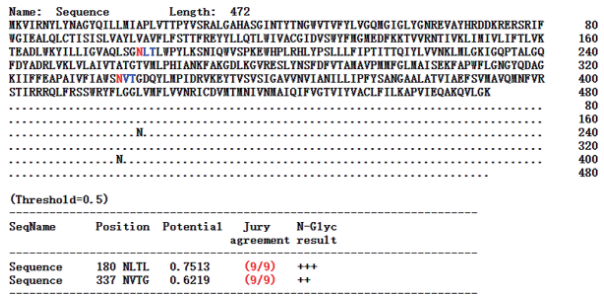

图 8　Wzx 磷酸化位点预测

Fig.8　Phosphorylation sites prediction of Wzx

## 2.5　Wzx 的磷酸化位点和糖基化位点

2.5.1　Wzx 的磷酸化位点　磷酸化是一种常见的蛋白质翻译后修饰过程，涉及将磷酸基团共价连接到蛋白质分子的氨基酸残基上，特别是丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基[20]。磷酸化修饰对蛋白质的功能调控具有重要影响[21]，包括酶活性、蛋白质-蛋白质相互作用、亚细胞定位和信号转导等。通过 NetPhos 3.1 Server 在线分析 Wzx 的磷酸化修饰位点，结果如图 8 所示。分析数据显示，Wzx 共有 33 个达到显著性阈值的潜在磷酸化修饰位点，这些修饰位点分布在蛋白质的不同区域，暗示着 Wzx 可能通过多种磷酸化修饰来调节其功能和活性，进而影响其参与 ESP 的合成与转运过程。在这些显著性磷酸化位点中，包含 14 个丝氨酸(Ser)残基，12 个苏氨酸(Thr)残基以及 7 个酪氨酸(Tyr)残基。丝氨酸和苏氨酸位点的数量较多，表明这些残基在磷酸化过程中更为常见，这与它们在细胞信号传导中的普遍作用一致[22]。尽管酪氨酸磷酸化位点较少，但它在细胞信号传导中同样关键[23]，尤其是在生长因子受体和激酶调控中[24]。进一步观察发现，Wzx 的磷酸化修饰位点主要集中在与蛋白质的酶活性、底物结合有关的功能域和结构域的关键区域，磷酸化修饰可能通过改变这些区域的电荷状态、构象或与其他分子的相互作用，从而精细调控 Wzx 的功能，从而影响其参与 ESP 合成与转运的过程。

2.5.2　Wzx 的糖基化位点　糖基化是一种重要的蛋白质翻译后修饰，涉及将糖类分子连接到蛋白质的特定氨基酸残基上[25]。为了深入探究 Wzx 的糖基化修饰情况，利用 NetNGlyc 1.0 在线分析 Wzx 的糖基化位点，如图 9 所示。由图 9 可知，Wzx 中存在若干潜在的糖基化位点，这些糖基化位点可能通过影响蛋



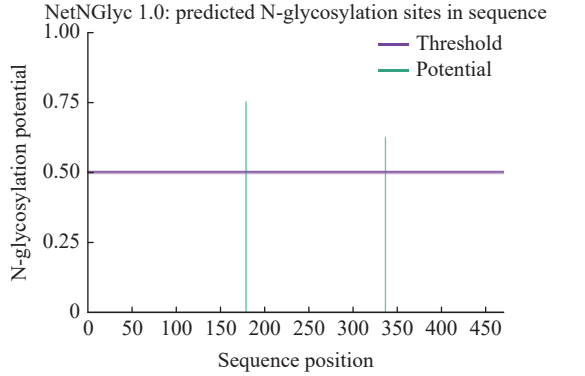




图 9 Wzx 糖基化位点预测

Fig.9 Prediction of Glycosylation Sites in Wzx

白质的折叠、稳定性和与其他分子的相互作用，从而调控 Wzx 的功能和活性。但由于 Wzx 序列不包含信号肽，没有信号肽的蛋白质不太可能暴露于 N-糖基化机制[26]，因此即使 Wzx 含有潜在的基序，也不会被糖基化（在体内）。这一发现说明 Wzx 的功能和活性调控可能不依赖于传统的 N-糖基化修饰机制，而可能通过其他的机制来实现。因此，有必要进一步探索 Wzx 的结构性质和作用方式，以更全面地理解其在发酵粘液乳杆菌 A51 胞外多糖合成和转运中的作用。

## 2.6 Wzx 的二级结构和空间结构

利用 SOPMA 在线网站对 Wzx 的二级结构进行预测，以期理解其在发酵粘液乳杆菌 A51 胞外多糖转运中的具体作用方式。如图 10 所示，Wzx 的二级结构含量由 61.44% 的 $\alpha$-螺旋、22.25% 的无规则卷曲和 16.31% 的延伸链组成。结果表明，Wzx 的二级结构的主要成分为 $\alpha$-螺旋和无规则卷曲，其中 $\alpha$-螺旋占比最高，无规则卷曲次之，延伸链最后，与跨膜域分析结果一致。$\alpha$-螺旋作为蛋白质二级结构的主要成分，对于维持蛋白质的稳定性和功能具有重要作用。此外，高比例的 $\alpha$-螺旋可能有助于维持其结构的稳定性和翻转酶活性的发挥，无规则卷曲和延伸链则可能参与蛋白质与其他分子的相互作用，以及蛋白质在细胞内的定位和功能实现。

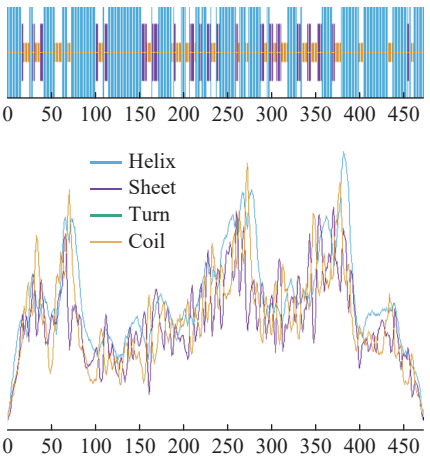



图 10 Wzx 二级结构预测

Fig.10 Secondary structure prediction of Wzx

注：蓝线为 $\alpha$-螺旋，紫线为延伸链，绿线为 $\beta$-转角，橙线为无规则卷曲。

为了更深入地了解翻转酶 Wzx 的结构与功能关系，进一步利用 SWISS-MODEL 在线网站对翻转酶 Wzx 单体进行三级结构的预测同源建模，结果如图 11 所示。结果显示，Wzx 的三级结构中 GMQE（Global Model Quality Estimation，GMQE）值为 0.91，反映了模型全局质量的估计，接近 1 的值表示模型质量高[27]。QMEAN（Qualitative Model Energy Analysis，QMEAN）值为 0.61，高于 0.5，说明得出的模型具有较好的质量[28]。序列相似度为 71.40%，说明目标序列与模板序列有较高的相似性，确保了模型结构的准确性。值得注意的是，$\alpha$-螺旋在三级结构中的排列和分布与二级结构预测结果相一致，进一步证实了 $\alpha$-螺旋在 Wzx 结构中的重要性。此外，三级结构预测还揭示了可能的功能域和结合位点，这些区域可能参与与其他分子的相互作用，从而调节 Wzx 的翻转酶活性及其在细胞内的功能实现。通过同源建模获得的三级结构为理解 Wzx 的结构与功能关系提供了重要的线索，也为后续的功能验证和改造奠定了基础。

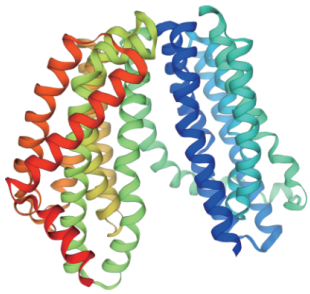


图 11 翻转酶 Wzx 三级结构预测结果

Fig.11 Predicted tertiary structure of the flippase Wzx

Wzx 单体结构的 Ramachandran plot 模型结果显示，其最适二面角区域内的氨基酸残基占比为 97.87%，表明 Wzx 单体结构中的氨基酸排列合理，具备良好的立体化学特性。由图 12 可知，PROCHECK 检验结果显示，Wzx 的单体三维构象中，氨基酸残基分布如下：96.0% 位于有利区域，3.5% 处于额外允许区域、0.2% 位于一般允许区域，另有 0.2% 位于不允许区域，进一步观察发现，该模型中的甘氨酸、脯氨酸等特定氨基酸残基处于允许的二面角区域，这些氨

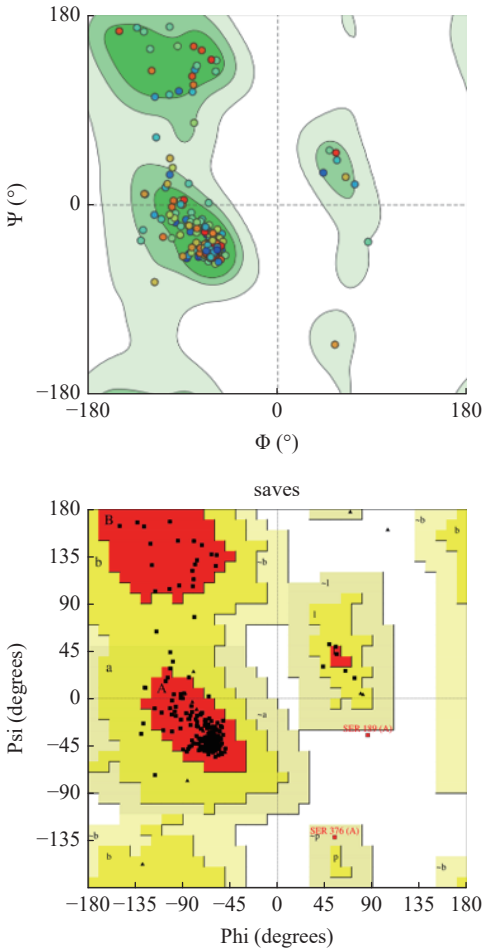



图 12　Wzx 单体三级结构的 PROCHECK 评估

Fig.12　PROCHECK evaluation of the monomeric tertiary structure of Wzx

基酸在维持蛋白质稳定性和功能方面起着重要作用，进一步证明了 Wzx 单体结构模型的可靠性。值得注意的是，Wzx 中的 α-螺旋结构可能与其作为翻转酶的功能密切相关，有助于蛋白在细胞膜上的定位和翻转过程的实现。Wzx 的二级结构和空间结构特征为其在胞外多糖合成和转运中的功能提供了重要的结构基础。

### 2.7　Wzx 的作用方式分析

根据 Wzx 三级结构预测结果可知，Wzx 的单体结构呈“V”状结构，推测 Wzx 转运胞外多糖的方式可能与葡萄糖转运蛋白 IICB Glc 和溶酶体胱氨酸转运蛋白 cystinosin 作用方式一致，即通过构象翻转或构象改变实现物质的转运[29−31]。图 13 为 Wzx 转运胞外多糖的两种可能作用方式。一种方式是 Wzx 作为翻转酶，利用其 α-螺旋结构在细胞膜上定位，并通过特定的门控残基与胞外多糖相互作用，从而实现胞外多糖的翻转和转运。另一种可能的方式是 Wzx 通过自身构型的转变，开口由向内逐步转为向外(开口向内状态→结合态→向外开放状态)，实现对胞外多糖的识别、结合和转运，最终实现胞外多糖由胞内转运至细胞外。这种构型转变可能受到细胞内信号分子的调控，如特定的磷酸化或糖基化修饰，这些修饰可以改变 Wzx 的构象稳定性或与其他蛋白的相互作用，从而调节其翻转酶的活性。此外，Wzx 的亚细胞定位和功能域分析也为其在胞外多糖合成和转运中的具体作用提供了线索。

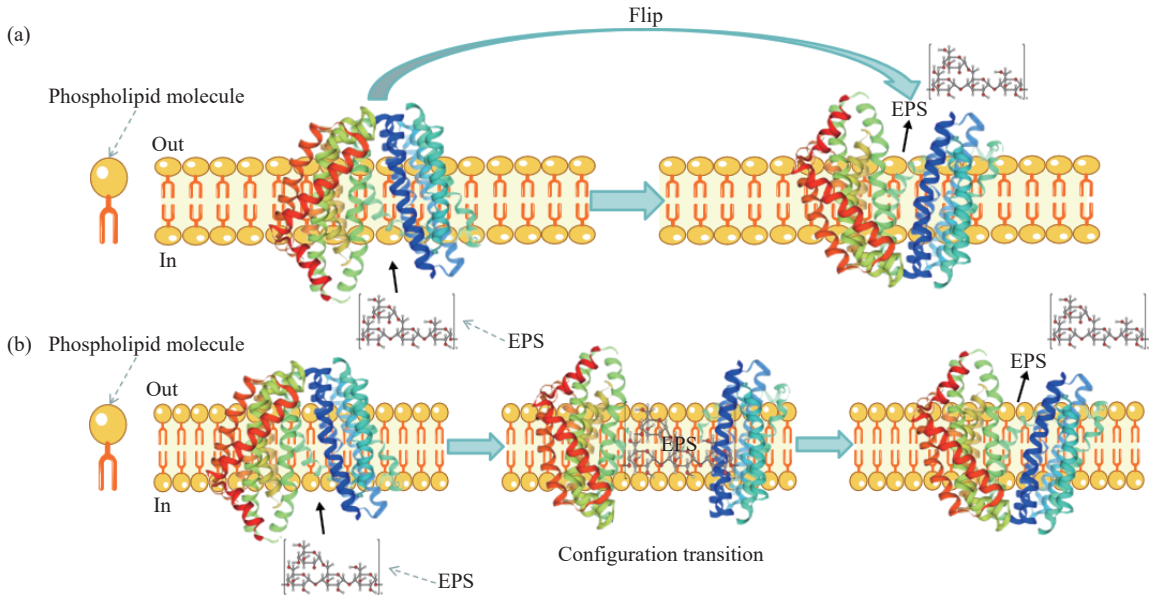



图 13　Wzx 胞内两种作用方式推测

Fig.13　Two proposed modes of action of Wzx within the cell

注：(a)Wzx 通过构象翻转实现 ESP 的转运；(b)Wzx 通过构象改变实现 ESP 的转运。

## 3　结论

本文运用多种生物信息学在线软件对 Wzx 的结构性质和功能特性进行深入分析，全面了解其性质和功能。结果表明，Wzx 为由 472 个氨基酸编码的具有高度稳定性的碱性疏水性蛋白，分子量约为 53.31 kDa，含有 7651 个原子，理论等电点为 9.50，

不稳定系数为 33.79，不含信号肽，存在 14 个跨膜螺旋结构；Wzx 共有 33 个达到显著性阈值的潜在磷酸化修饰位点，其中包含 14 个丝氨酸（Ser）位点、12 个苏氨酸（Thr）位点以及 7 个酪氨酸（Tyr）位点。翻转酶 Wzx 的二级结构以 $\alpha$-螺旋为主，占 61.44%，三维结构被折叠成“V”状结构。Wzx 可能通过构象翻转或构象改变两种作用方式实现胞外多糖的转运。研究为深入理解 Wzx 的结构性质及作用机制提供理论依据，对于理解胞外多糖的转运具有重要意义。然而，尽管本研究通过生物信息学方法对 Wzx 进行了较为全面的分析，揭示了 Wzx 的基本理化性质、结构特征以及可能的转运机制，但仍需通过实验验证来进一步确认这些预测结果的准确性。此外，Wzx 与其他翻转酶之间的异同、在胞外多糖转运过程中的具体作用机制以及是否受到其他因素的调控等问题也有待进一步探究。因此，今后的研究方向将聚焦于通过实验手段揭示 Wzx 的构象变化机制，以及利用先进的蛋白质组学和代谢组学技术，深入解析 Wzx 在胞外多糖合成和转运过程中的作用，以期为全面理解胞外多糖的转运机制提供更为详尽的理论依据。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

## 参考文献


[1] 张玥, 张超, 刁梦奇, 等. 微生物胞外多糖的生物合成途径[J]. 生命的化学, 2024, 44(7): 1270−1280. [ZHANG Yue, ZHANG Chao, DIAO Mengqi, et al. The biosynthetic pathways of microbial exopolysaccharides[J]. Chemistry of Life, 2024, 44(7): 1270−1280.]

[2] 李佳欣, 杨玉霞, 陶然, 等. 微生物产胞外多糖研究进展[J]. 粮油食品科技, 2024, 32(5): 169−176. [LI Jiaxin, YANG Yuxia, TAO Ran, et al. Research progress of exopoly saccharide produced by microorganisms[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2024, 32(5): 169−176.]

[3] SUTHERLAND I. Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework[J]. Microbiology, 2001, 147(Pt 1): 3−9.

[4] MENOLLI R A, TESSARO F H G, DO AMARAL A E, et al. Biotech application of exopolysaccharides from *Curvularia brachyspora*: Optimization of production, structural characterization, and biological activity[J]. Molecules, 2023, 28(11): 16.

[5] 石金铭, 陈秋羽, 刘昭曦, 等. 乳杆菌胞外多糖合成基因簇及构效关系[J]. 微生物学报, 2023, 63(9): 3482−3499. [SHI Jinming, CHEN Qiuyu, LIU Zhaoxi, et al. *Lactobacillus* exopolysaccharide: Gene clusters for synthesis and structure-activity relationship[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(9): 3482−3499.]

[6] HVORUP R N, WINNEN B, CHANG A B, et al. The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily[J]. European Journal of Biochemistry, 2003, 270(5): 799−813.

[7] WHITFIELD C, TRENT M S. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides[J]. Annual Review of Biochemistry, 2014, 83: 99−128.

[8] WEI Guangqiang, WANG Daodian, WANG Teng, et al. Probiotic potential and safety properties of *Limosilactobacillus fermentum* A51 with high exopolysaccharide production[J]. Frontiers in Microbiology, 2025, 16: 1498352.

[9] HONG Y Q, LIU M A, REEVES P R. Progress in our understanding of Wzx flippase for translocation of bacterial membrane lipid-linked oligosaccharide[J]. Journal of Bacteriology, 2018, 200(1): e00154−17.

[10] KUMAR S, NUSSINOV R. Relationship between ion pair geometries and electrostatic strengths in proteins[J]. Biophysical Journal, 2002, 83(3): 1595−1612.

[11] 于惠敏, 王会勇, 王军, 等. 拟南芥细胞分裂素糖基转移酶 UGT76C2 的 N 端亮氨酸替换对酶活性的影响[J]. 植物生理学报, 2014, 50(11): 1659−1668. [YU Huimin, WANG Huiyong, WANG Jun, et al. Effect of the N-terminal leucine substitution on the enzyme activity of cytokinin glucosyltransferase UGT76C2 of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Physiology Journal, 2014, 50(11): 1659−1668.]

[12] ISLAM S T, LAM J S. Wzx flippase-mediated membrane translocation of sugar polymer precursors in bacteria[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(4): 1001−1015.

[13] OMOTE H, HIASA M, MATSUMOTO T, et al. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2006, 27(11): 587−593.

[14] 夏芳, 冯宙, 姜舟婷. 分子动力学模拟研究氨基酸亲疏水性质对蛋白质结构的影响[J]. 中国计量大学学报, 2024, 35(3): 415−421. [XIA Fang, FENG Zhou, JIANG Zhouting. A study of the hydrophobicity of amino acids on the structure of proteins by molecular dynamics simulation[J]. Journal of China University of Metrology, 2024, 35(3): 415−421.]

[15] HUG I, ZHENG B, REIZ B, et al. Exploiting bacterial glycosylation machineries for the synthesis of a lewis antigen-containing glycoprotein[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(43): 37887−37894.

[16] BALDWIN R L, ROSE G D. How the hydrophobic factor drives protein folding[J]. PNAS, 2016, 113(44): 12462−12466.

[17] 赵文悦, 杨景, 邵怡岚, 等. 表达牛乳铁蛋白肽的罗伊氏乳杆菌分泌型信号肽的筛选及鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2025, 56(3): 1431−1440. [ZHAO Wenyue, YANG Jing, SHAO Yilan, et al. Screening and identification of secretory signal peptide of *Lactobacillus reuteri* expressing lactoferrin peptide[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2025, 56(3): 1431−1440.]

[18] 马权超. 跨膜蛋白寡聚物模态预测及关键残基筛选[D]. 南昌: 江西科技师范大学, 2022. [MA Quanchao. Modality prediction and key residues screening of transmembrane protein oligomers[D]. Nanchang: Jiangxi Science and Technology Normal University, 2022.]

[19] 金承昊, 冯宙, 姜舟婷. $\alpha$ 螺旋结构影响蛋白质稳定性的模拟研究[J]. 中国计量大学学报, 2023, 34(2): 265−270. [JIN Chenghao, FENG Zhou, JIANG Zhouting. Effect of $\alpha$-helix on structural stability of protein by simulation[J]. Journal of China University of Metrology, 2023, 34(2): 265−270.]

[20] 刘萧然, 邢美宁, 应万涛. 蛋白质组氨酸磷酸化修饰的调节及功能作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2024, 51(10): 2694−2704. [LIU Xiaoran, XING Meining, YING Wantao. Regulation and function of protein histidine phosphorylation[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2024, 51(10): 2694−2704.]

[21] BELTRAO P, ALBANÈSE V, KENNER L R, et al. Systematic functional prioritization of protein posttranslational modifica-

tions[J]. Cell, 2012, 150(2): 413−425.
[22] 杨白梅, 鲁猛, 骆思君, 等. 全反式维甲酸联合小剂量阿糖胞苷对急性髓系白血病细胞磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶信号通路的作用机制研究[J]. 陕西医学杂志, 2024, 53(1): 28−31,36. [YANG Baimei, LU Meng, LUO Sijun, et al. Mechanism of all-trans retinoic acid combined with low-dose cytarabine on PI3K/AKT signaling pathway of acute myeloid leukemia cells[J]. Shaanxi Medical Journal, 2024, 53(1): 28−31,36.]
[23] COURTNEY A H, LO W L, WEISS A. TCR signaling: Mechanisms of initiation and propagation[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2018, 43(2): 108−123.
[24] ROBINSON D R, WU Y M, LIN S F. The protein tyrosine kinase family of the human genome[J]. Oncogene, 2000, 19(49): 5548−5557.
[25] 张斌成, 陆佳伟, 李燕苹, 等. 糖基化蛋白质的功能特性及应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2025, 46(17): 480−489. [ZHANG Bincheng, LU Jiawei, LI Yanping, et al. Research progress on the function properties and application of glycosylated proteins[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(17): 480−489.]
[26] 唐彬. 重组角蛋白酶辅助透皮给药系统的构建及评价[D]. 重庆: 重庆理工大学, 2024. [TANG Bin. Construction and evaluation of recombinant keratinase-assisted transdermal drug delivery system[D]. Chongqing: Chongqing University of Technology, 2024.]
[27] STUDER G, REMPFER C, WATERHOUSE A M, et al. QMEANDisCo-distance constraints applied on model quality estimation[J]. Bioinformatics, 2020, 36(8): 2647.
[28] WATERHOUSE A, BERTONI M, BIENERT S, et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): W296−W303.
[29] ROTH P, JECKELMANN J M, FENDER I, et al. Structure and mechanism of a phosphotransferase system glucose transporter [J]. Nature Communications, 2024, 15: 7992.
[30] 江诚, 谢俊, 陈海峰. 葡萄糖转运蛋白的转运机制研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(7): 1372−1377. [JIANG Cheng, XIE Jun, CHEN Haifeng. The mechanism of conformation transformation of glucose transporter 1[J]. Genomics and Applied Biology, 2015, 34(7): 1372−1377.]
[31] GUO X, SCHMIEGE P, ASSAFA T E, et al. Structure and mechanism of human cystine exporter cystinosin[J]. Cell, 2022, 185(20): 3739−3752: e18.