

核心多糖结构变异对大肠杆菌自凝集特性的影响

王 洲^{1,2}, 李 烨^{1,2}, 任 格^{1,2}, 王小元^{*1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 以大肠杆菌 K-12 菌株为研究对象, 通过对比分析野生型 W3110 及脂多糖分子核心多糖结构变异菌株的自凝集特性, 对细胞膜上核心多糖结构与细菌自凝集的相关性进行分析。结果表明, 核心多糖的结构变异会增加大肠杆菌的自凝集能力, 在 4 ℃ 下静置 12 h, 突变菌株自凝集率较野生型菌株提高近 3 倍。以核心多糖缺失突变菌株 $\Delta waaC$ 和外核心糖缺失突变菌株 $\Delta waaG$ 为研究对象, 进行菌株自凝集动力曲线测定。结果表明, 在静置 2 h 后, 菌株自凝集率均可达 80% 以上。通过对不同温度和不同菌液浓度下菌株自凝集特性的分析, 温度与菌株的自凝集特性无明显相关性, 而较高的菌液浓度能够提高菌株的自凝集能力。为分析突变菌株自凝集形成机制, 以野生型 W3110 为对照, 对突变菌株自转运蛋白编码基因 *flu* 进行 RT-PCR 分析, 突变菌株中 *flu* 基因的转录水平增加 2~4 倍。同时, 利用表达质粒 pWSK29 构建自转运蛋白质表达载体, 通过诱导表达, 确定自转运蛋白质在大肠杆菌 W3110 自凝集中的作用。

关键词: 脂多糖; 核心多糖; 细胞膜; 自凝集; 自转运蛋白

中图分类号: Q 939.97 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)06-0569-07

Effect of Core Oligosaccharide Structural Transformation on Autoaggregation in *Escherichia coli*

WANG Zhou^{1,2}, LI Ye^{1,2}, REN Ge^{1,2}, WANG Xiaoyuan^{*1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The autoaggregation level of *E. coli* K-12 W3110 was tested by the comparison with its mutants in core oligosaccharide (core OS), and the relationship between autoaggregation and the structure of core oligosaccharide was analyzed. The results showed that the mutation of core OS would induced autoaggregation. The autoaggregation ratio of mutants were three times better than wild type W3110 in 12 hours of standing at 4 ℃. The mutants of core OS deficiency ($\Delta waaC$) and outer core OS deficiency ($\Delta waaG$) were used to investigate the properties of autoaggregation. In this

收稿日期: 2015-09-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170069); 国家 973 计划项目(2012CB725202)。

作者简介: 王 洲(1979—), 男, 安徽合肥人, 发酵工程博士研究生, 主要从事大肠杆菌脂多糖分子核心多糖结构与功能研究。

E-mail: wangzhou0920@126.com

* 通信作者: 王小元(1965—), 男, 山西垣曲人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事工业微生物细胞膜和细胞壁结构精简研究。

E-mail: xwang@jiangnan.edu.cn

引用本文: 王洲, 李烨, 任格, 等. 核心多糖结构变异对大肠杆菌自凝集特性的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(06): 569-575.

study, the autoaggregation ratios of $\Delta waaC$ and $\Delta waaG$ strains were 80% after 2 hours of static culture. The autoaggregation level with different temperature and cell concentration were also tested, the results indicated that the autoaggregation was not influenced by the temperature, but enhanced by the increase of cell concentration. In order to elucidate the mechanism of autoaggregation, the transcription level of *flu* (gene of Ag43) was analyzed between W3110 and the mutants by RT-PCR, and the results showed that the transcription of *flu* was raised 2~4 times in the mutants of core OS, and it may be the reason of the increase of autoaggregation ratio in mutants. Finally, the preliminary results of gene expression of *flu* proved the effect of Ag43 on autoaggregation in W3110.

Keywords: lipopolysaccharide, core oligosaccharide, cell membrane, autoaggregation, autotransporter

脂多糖分子存在于革兰氏阴性细菌细胞外膜外侧, 主要由类脂 A、核心多糖和 O-抗原三部分组成^[1-2]。其中, 类脂 A 作为细菌毒力因子的主要部分, 结构保守性较高; O-抗原作为细菌对宿主侵染识别的主要部分, 为适应菌株对不同宿主的识别, 结构多样性较大; 而作为脂多糖分子中的中间部分, 核心多糖主要负责连接类脂 A 与 O-抗原结构。因此, 结构多样性介于类脂 A 与 O-抗原之间, 其具体结构及其合成基因见图 1。核心多糖是庚糖、葡萄糖和半乳糖构成的多糖结构, 分别由 8 个糖基转移酶和 2 个磷酸基团转移酶催化合成^[1,3]。核心多糖结构可分为内核心糖与外核心糖两个部分, 邻近类脂 A 的部分为内核心糖, 由 Kdo 分子和庚糖基组成, 其组成相对保守; 邻近 O-抗原的部分为外核心糖, 由葡萄糖、半乳糖和庚糖等糖基组成, 其组成在种属内具有一定的多样性。正是由于内、外核心的这种结构特性, 保证了核心多糖在脂多糖分子中的稳定性和多样性。由于细菌的定殖和感染能力多与细胞表面结构有关, 因此, 作为细胞膜外侧的脂多糖分子除了影响着细胞膜的结构完整性和稳定性外, 对细胞的膜壁特性也具有重要的作用^[4-9]。

细胞凝集是指细胞间通过相互识别而形成的一种聚集状态, 表现为细菌在静置后出现菌体絮凝沉淀^[10]。微生物的细胞凝集主要有不同菌株间的共凝集和同一菌株间的自凝集两种类型, 其中自凝集作为菌株间相互识别的一类群体行为而受到广泛关注。在临床医学研究中, 病原微生物的自凝集常与细菌菌膜的形成、对人体细胞的粘附以及菌株的致病性有关^[11-13]; 而在工业生产中, 细菌的自凝集特性却有着潜在的应用价值, 可被用于发酵菌种的后期分离, 以提高发酵后期的菌株产物分离效果, 减少生产成本^[14-16]。有研究表明, 细菌自凝集特性与细

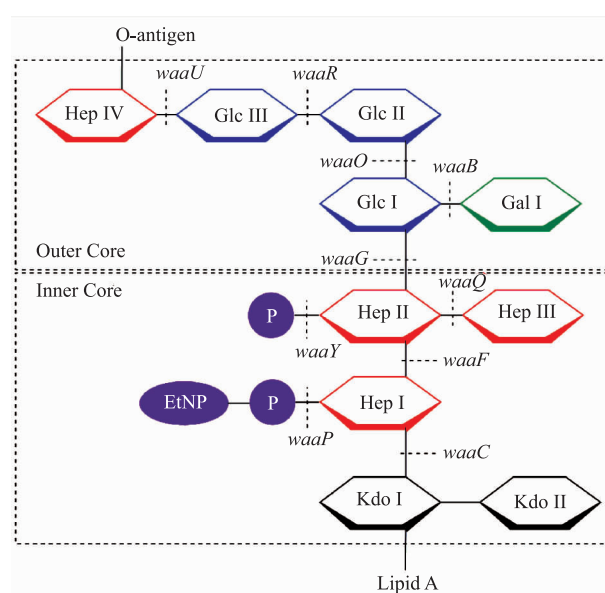


图 1 大肠杆菌脂多糖分子结构示意图 (核心多糖结构)

Fig. 1 Structure of lipopolysaccharide of *E. coli* (the core oligosaccharide)

胞表面的自转运蛋白 (Ag43)、鞭毛、菌毛以及环境条件有密切关系^[17-19]。其中, 自转运蛋白作为一类革兰氏阴性细菌中最大的蛋白质家族, 在蛋白质分泌、转运和细胞间的互作中起到重要作用^[20-21]。脂多糖分子作为细胞膜上的一类生物大分子物质, 对细胞表面的蛋白质转运与定位产生重要影响。因此, 作者以大肠杆菌 K-12 菌株 W3110 为研究对象, 对其脂多糖分子核心多糖结构变异菌株的自凝集特性进行测定, 通过探究影响自凝集的因素, 对脂多糖分子与细菌自凝集的相关性进行初步解析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 实验菌株及质粒见表 1。大肠

杆菌 DH5 α 、大肠杆菌 W3110 和表达载体 pWSK29;作者所在实验室保藏;核心多糖突变菌株与表达质粒 pWSK29-*flu*;作者所在实验室构建^[22]。其中,实验采用核心多糖突变菌株是以大肠杆菌 K12 野生型 W3110 为出发菌株,利用 Red 同源重组系统,针对大肠杆菌核心多糖合成途径关键基因进行定点敲除,构建获得不同核心多糖结构的突变菌株,用以开展核心多糖结构与细菌自凝集的相关性研究,见图 1。在之前的研究中,已对各菌株的核心多糖结构进行了鉴定,具体菌株核心多糖结构参见表 1。

表 1 研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmid used in this study

菌株	特性	核心多糖结构
DH5 α	Wild type strain	
W3110	Wild type, F ⁻ , λ -	Hep4-Glc3-Glc2-(Gal-)Glc1-(Hep3-)(P-)Hep2-(<i>PEtN</i> -P-)Hep1-KDO ₂ -lipdA
$\Delta waaC$	W3110 $\Delta waaC$	KDO ₂ -lipdA
$\Delta waaF$	W3110 $\Delta waaF$	PEtN-P-Hep1-KDO ₂ -lipdA
$\Delta waaG$	W3110 $\Delta waaG$	Hep2-(<i>PEtN</i> -P)-Hep1-KDO ₂ -lipdA
$\Delta waaO$	W3110 $\Delta waaO$	Gal-Glc1-(Hep3-)(P-)Hep2-(<i>PEtN</i> -P-)Hep1-KDO ₂ -lipdA
$\Delta waaR$	W3110 $\Delta waaR$	Glc2-(Gal-)Glc1-(Hep3-)(P-)Hep2-(<i>PEtN</i> -P-)Hep1-KDO ₂ -lipdA
$\Delta waaU$	W3110 $\Delta waaU$	Glc3-Glc2-(Gal-)Glc1-(Hep3-)(P-)Hep2-(<i>PEtN</i> -P-)Hep1-KDO ₂ -lipdA
质粒	特性	来源
pWSK29	Low copy vector, Amp ^R	Laboratory vector ^[22]
pWSK29- <i>flu</i>	pWSK29 harboring <i>flu</i>	This work

按照 Roux^[24]的方法,测定细胞自身凝集特性,具体操作如下:首先,按初始 OD₆₀₀ 为 0.02 将过夜培养的菌液转接到 30 mL LB 培养液中,37 ℃ 培养至 OD₆₀₀ 为 3.0。6 000 *g* 离心 10 min 收集菌体后,用磷酸缓冲液洗涤菌体一次并重悬浮,重悬浮 OD₆₀₀ 均控制在 2.5。然后取重悬浮液 5 mL 置于试管中,在 4 ℃ 下静置 12 h,测定各培养物液面下 1 cm 处的菌液浓度,每个样品设三个平行。根据公式计算自凝集能力的大小。

自凝集率(%)=

$$\frac{\text{自凝集前 OD}_{600}-\text{自凝集后上层菌液 OD}_{600}}{\text{自凝集前 OD}_{600}}$$

1.2.2 菌株自凝集曲线测定 将过夜培养的大肠杆菌 W3110、核心糖缺失菌株 $\Delta waaC$ 和外核心糖缺失菌株 $\Delta waaG$,收集菌体后以磷酸盐缓冲液漂洗沉淀并制备菌悬液,菌悬液初始浓度设定 OD₆₀₀ 为 2.5,置于 4 ℃ 下,分别于静置 2、4、7、12 h,测定菌株的凝集率,绘制大肠杆菌自凝集曲线,分析菌株自凝集的时间变化规律。

1.1.2 培养基 LB 培养基:酵母浸提物 5 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,NaCl 10 g/L,用于大肠杆菌 W3110 及突变菌株的培养和感受态细胞种子液的制备;相应的固体培养基中加入琼脂粉 18 g/L。

1.2 方法

1.2.1 菌株自凝集率的测定 选取不同核心多糖糖链长度的突变菌株,以野生型大肠杆菌 W3110 为对照,对各菌株的自凝集率进行测定,考察核心多糖结构差异对菌株自凝集率的影响,各菌株脂多糖分子结构差异见表 1。

1.2.3 温度对菌株自凝集率的影响 以大肠杆菌 W3110、 $\Delta waaC$ 和 $\Delta waaG$ 为研究对象,过夜培养后,以磷酸盐缓冲液漂洗菌体并制备菌悬液,设置初始 OD₆₀₀ 为 2.5,分别置于 4、22、30、37 ℃ 条件下,静置 12 h 取样,测定不同温度条件下各菌株的自凝集率,分析温度对菌株自凝集的影响。

1.2.4 菌液浓度对菌株自凝集率的影响 细菌的自凝集依赖于菌株细胞间的相互识别和粘附作用,而菌液浓度即单位体积的菌体数量的差异也会对细胞间的粘附性产生影响。因此,为考察菌液浓度对细菌自凝集的影响,针对三株大肠杆菌 W3110、 $\Delta waaC$ 和 $\Delta waaG$,分别测定不同初始菌浓 (OD₆₀₀=3.5、2.5、1.5) 条件下的自凝集率。

1.2.5 自转运蛋白 Ag43 表达水平分析 细菌表面抗原 43(Ag43)是大肠杆菌表达于细菌表面的一个抗原分子,属于自转运家族成员之一。有研究表明,Ag43 在细菌自凝集过程中对细胞间的粘附产生作用^[17,19,25]。为研究核心多糖突变菌株中 Ag43 的表达特性,利用荧光定量 PCR 技术对其编码基因 *flu* 的

转录水平进行检测。依据 NCBI 中 Y75_p1961 序列,设计 *flu* 基因 RT-PCR 引物,并以核糖体 RNA 基因 *rrnG* 作为内标,引物序列见表 2。用 ABI 定量 PCR 仪,进行 Real-time RT-PCR 扩增,RT-PCR 的反应程序为:94 ℃ 1 min,接着进入如下循环:94 ℃ 10 s,55 ℃ 30 s,68 ℃ 15 s,共计 40 个循环。反应程序结束后,读取样品基因对应的 *Ct* 值,以野生型 *flu* 基因 *Ct* 值为对照,计算突变菌株 *flu* 基因的 ΔCt 值,并采用 $2^{-\Delta Ct}$ 方法计算 *flu* 基因的相对表达水平^[26-27]。

表 2 引物序列

Table 2 Sequence of the primers in this study

基因	序列(5'—3') (F: 正义引物; R: 反义引物)	产物 长度/bp
<i>rrnG</i>	F: GTATTCACCGTGGCATTCTG	103
	R: GCGGACCTCATAAAGTGCG	
<i>flu</i> for RT-PCR	F: ACAGCCACGAATGTCACC	103
	R: CCTCCACAAC AGAGAATGC	
<i>flu</i> for expression	F: CGGGATCCAAGGAGATATACC ATGAAACGACATCTG	3149
	R: CGGAATTCTCAGAAGGTCACA TTCAGT	

1.2.6 自转运蛋白 Ag43 的过量表达分析 以 NCBI Y75_p1961 序列为模板,设计 *flu* 基因表达引物。PCR 扩增获得自凝集蛋白表达基因 *flu*,以大肠杆菌低拷贝强启动子表达质粒 pWSK29 为载体,构建自转运蛋白表达载体 pWSK29-*flu*,并转化至宿主 W3110、 $\Delta waaC$ 和 $\Delta waaG$ 中,以空载菌株 W3110/pWSK29、 $\Delta waaC$ /pWSK29 和 $\Delta waaG$ /pWSK29 为对照,分别测定自转运蛋白 Ag43 表达菌株 W3110/pWSK29-*flu*、 $\Delta waaC$ /pWSK29-*flu*、 $\Delta waaG$ /pWSK29-*flu* 的自凝集率,分析自转运蛋白 Ag43 在各菌株中的强化表达特性。

2 结果与分析

2.1 不同核心多糖结构菌株的自凝集特性

选取不同核心多糖糖链长度的突变菌株为研究对象,对各突变菌株的自凝集性能进行测定。在 4 ℃ 下静置 12 h 后测定各菌株的自凝集率,结果见图 2。大肠杆菌 W3110 自凝集率在 30% 左右,而核心多糖结构缺失引起菌株自凝集率的增加,突变菌株自凝集率均达到 90% 左右,并且各突变菌株间的自凝集率无明显差异。由此可见,脂多糖分子核心

多糖结构的改变,会引起菌体自凝集率的增加。

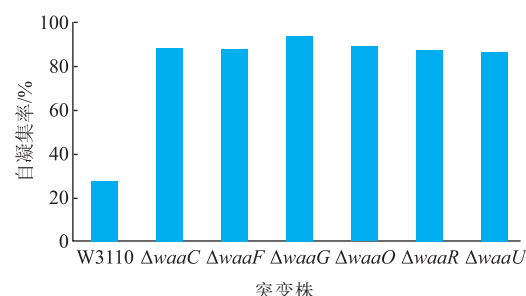


图 2 大肠杆菌不同核心多糖结构突变株的自凝集特性

Fig. 2 Autoaggregation of different LPS in *E. coli*

2.2 不同培养条件对菌株自凝集性的影响

2.2.1 菌株自凝集曲线 由于核心多糖缺失对自凝集变化的影响不存在结构的相关性,因此选取核心糖缺失菌株 $\Delta waaC$ 与外核心糖缺失菌株 $\Delta waaG$ 作为研究对象,并以野生型 W3110 为对照菌株,分别从时间、温度和菌液浓度方面考察培养条件对大肠杆菌 W3110 及核心多糖突变菌株自凝集特性的影响。

首先,通过绘制细菌自凝集曲线,在 3 株菌株在静置过程中,随着时间的延长,对自凝集率的变化规律进行研究,结果见图 3。由图 3 可以看出,较野生型 W3110,突变菌株 $\Delta waaC$ 和 $\Delta waaG$ 的自凝集效果明显,在静置 2 h 后即表现出明显的菌体凝集,但两突变菌株间的凝集特性无明显差异。在静置 2 h 后,突变菌株的自凝集率达到 80%,静置 7 h 后,突变菌株的自凝集率达到 90%,随后基本保持稳定,而野生型菌株的自凝集率在静置 12 h 后仅达到 30% 左右。

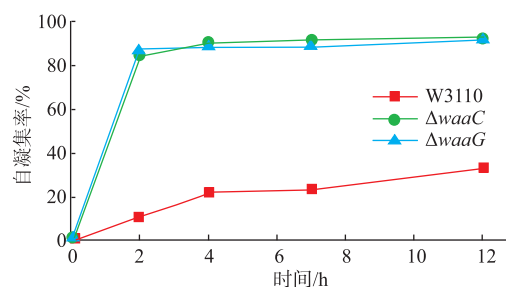


图 3 菌株自凝集曲线

Fig. 3 Aggregation curve of *E. coli*

2.2.2 温度对菌株自凝集特性的影响 在分析大肠杆菌自凝集过程的基础上,对不同温度条件下(4、22、30、37 ℃)的大肠杆菌自凝集率进行测定,结果见图 4。不同温度下,突变菌株自凝集率均高于野

生型 W3110, 表现为野生型 W3110 的自凝集率在 30% 左右, 突变菌株 $\Delta waaC$ 和 $\Delta waaG$ 的自凝集率均在 80% 左右。同时, 无论是野生型还是突变菌株, 在不同温度条件下, 同一菌株的自凝集率无明显差异, 即菌株的自凝集特性与其静置环境温度无特定相关性。

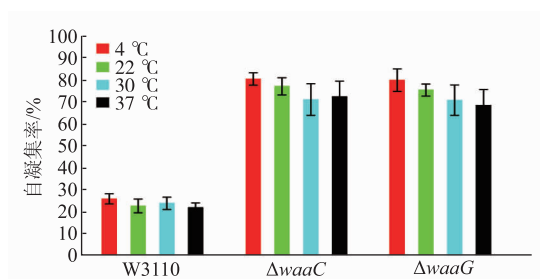


图 4 不同温度条件下细菌自凝集率

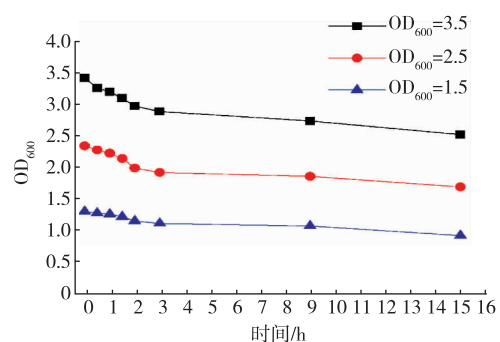
Fig. 4 Autoaggregation ratio of *E.coli* with different temperature

2.2.3 菌液浓度对菌株自凝集特性的影响 由于自凝集是细胞间的一种絮凝过程, 与细胞间互作有一定关系, 因此, 作者考察了不同初始菌浓条件下的菌株自凝集特性, 结果见图 5。由图 5(a) 可知, W3110 菌株在初始 OD₆₀₀ 为 3.5 和 2.5 条件下, OD 值曲线表现出相似的斜率, 即细菌沉降速率相同, 而 OD₆₀₀ 为 1.5 条件下, 菌体的沉降速率相对较低。由图 5(b)(c) 可以看出, 不同初始菌浓的突变菌株 $\Delta waaC$ 和 $\Delta waaG$, 在静置 3 h 内, 均表现出相似的较高沉降速率, 且高浓度菌株的沉降速率高于低浓度菌株, 3 h 以后所有菌株的沉降速率变缓。由此可以看出, 较高的菌液浓度可以提高细菌的沉降速率。

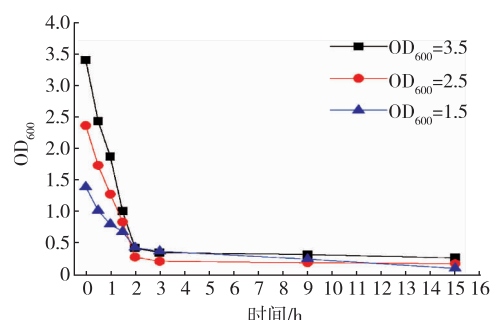
在细菌自凝集的作用机制研究中, Henrik^[17] 等指出, 细菌的自凝集依赖于细胞表面的自转运蛋白 Ag43, 在液体静置状态下, Ag43 蛋白通过分子间的相互识别和互作, 促使菌体细胞相互粘附和聚集, 对大肠杆菌的絮凝产生作用, 如图 5(d) 所示。因此, 单位体积的细胞数目即菌液浓度会对细胞表面自转运蛋白的互作频率产生影响, 从而影响菌体的沉降速率, 即自凝集率。

2.3 自转运蛋白 Ag43 对大肠杆菌核心多糖突变株自凝集特性的影响

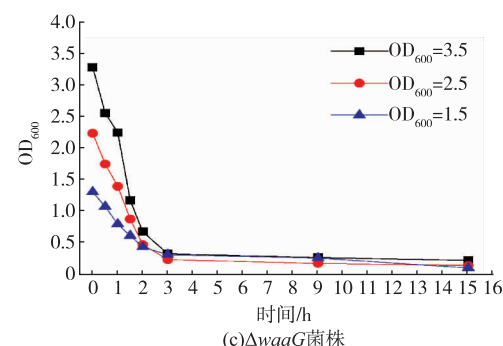
在明确自转运蛋白 Ag43 对细菌自凝集作用的基础上, 为探究在核心多糖结构变异对自凝集产生的作用, 作者对 Ag43 编码基因, *flu* 基因在各菌株中



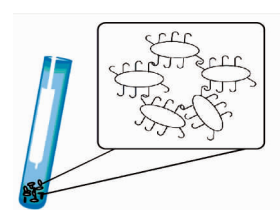
(a) W3110 菌株



(b) $\Delta waaC$ 菌株



(c) $\Delta waaG$ 菌株



(d) 自凝集菌体互作模型

图 5 不同初始浓度下的细菌自凝集率

Fig. 5 Autoaggregation ratio with different initial concentration of strains

的转录水平进行了测定分析, 结果见图 6(a)。由图 6 可知, 相对于野生型 W3110, 在核心糖突变菌株 $\Delta waaC$ 和 $\Delta waaG$ 中, *flu* 基因转录水平均有上调。初步分析, 在大肠杆菌 W3110 菌株中, 核心多糖结构变异会引起 *flu* 基因转录水平上调, 引起细胞表面自转运蛋白 Ag43 表达量的增加, 从而表现出较

强的自凝集特性。

为进一步考察自转运蛋白 Ag43 在大肠杆菌自凝集中的作用, 构建 Ag43 的大肠杆菌表达载体 pWSK29-*flu*, 利用化学转化的方法转入大肠杆菌 W3110 及突变菌株 $\Delta waaC$ 和 $\Delta waaG$ 中, 通过诱导表达后, 对各菌株的自凝集率进行测定, 并以对应的空载菌株作为对照, 结果见图 6(b)。

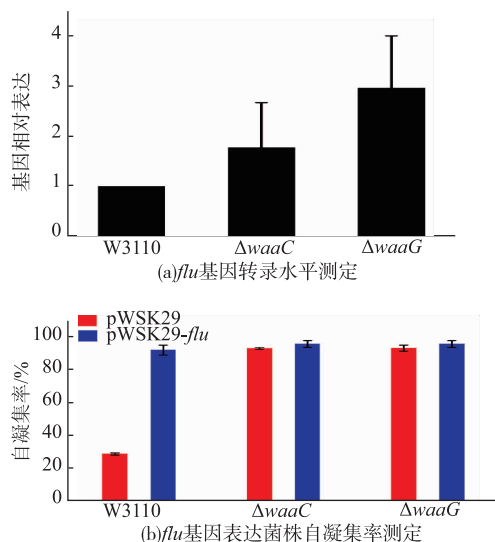


图 6 *flu* 基因转录和强化表达对菌株自凝集的影响

Fig. 6 Effect of the *flu* expression on autoaggregation

由图 6 可以看出, 在 W3110 中进行 *flu* 基因的表达可以明显地提高菌体的自凝集特性, 表达菌株自凝集率可达 90% 左右, 相对空载菌株 W3110/pWSK29 的自凝集率提高 3 倍。由此可确定, *flu* 基因表达在大肠杆菌自凝集过程中起着重要作用。相对野生型 W3110 自凝集的提高, *flu* 基因表达对突变菌株自凝集特性未表现出一定的作用。一方面, 突变菌株中 *flu* 基因的表达量较高, 额外过量表达该基因, 可能对其增效不够明显, 另一方面, *flu* 基

因产物 Ag43 蛋白是一类细胞表面蛋白质, 在突变菌株中, *flu* 基因的高水平表达会影响 Ag43 蛋白在细胞表面的含量处于较高或满载水平, 额外表达 Ag43 蛋白可能因此受限于细胞表面的蛋白质定位。

3 结 语

在大肠杆菌 W3110 中, 脂多糖分子核心多糖结构改变会对细菌的自凝集特性产生重要影响, 主要表现为菌株自凝集率的增加, 突变菌株自凝集率较野生型菌株提高 3 倍左右, 且突变菌株间的自凝集特性无明显差异。通过对不同温度和不同细胞浓度条件下菌株自凝集特性的分析表明, 静置温度与菌株的自凝集特性无关, 而菌液浓度对菌株的自凝集特性表现正相关作用。通过对突变菌株中 Ag43 蛋白编码基因 *flu* 的转录水平分析, 发现脂多糖分子的核心多糖结构修饰会引起 *flu* 基因的转录上调, 较野生型中该基因的转录水平上调 2~3 倍。最后通过对细胞膜上自转运蛋白 Ag43 的过量表达, 初步确定 Ag43 在大肠杆菌自凝集中的作用。在明确 Ag43 蛋白在细菌自凝集中的作用前提下, 可进一步对 Ag43 蛋白的表达调控展开研究, 通过对蛋白质表达调控机制的研究达到对细菌自凝集的控制目的。

脂多糖分子作为细胞膜的生物大分子, 除了作为细菌内毒素起到免疫应激作用外, 对细胞膜的稳定性和细胞内外的物质交换运输也具有调节作用, 本研究表明, 核心多糖结构的缺失在引起细胞膜脂多糖分子结构改变的同时, 细菌则通过提高自转运蛋白质的表达量来适应这种变化, 以自凝集的形式来促进细胞间的相互作用, 起到保护细胞结构稳定性, 增加细胞间的物质运输和信息交流, 共同适应脂多糖分子变异带来的改变。

参考文献:

- [1] RAETZ C R H, WHITFIELD C. Lipopolysaccharide endotoxins[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2002, 71: 635-700.
- [2] WANG X Y, QUINN P J. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification[J]. *Progress in Lipid Research*, 2009, 49(2): 97-107.
- [3] RONCERO C, CASADABAN M J. Genetic analysis of the genes involved in synthesis of the lipopolysaccharide core in *Escherichia coli* K-12: three operons in the *rfa* locus[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(10): 3250-3260.
- [4] KAWASAKI K. Complexity of lipopolysaccharide modifications in *Salmonella enterica*; Its effects on endotoxin activity, membrane permeability, and resistance to antimicrobial peptides[J]. *Food Research International*, 2011, 45(2): 493-501.
- [5] PARK B S, SONG D H, KIM H M, et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4 - MD-2 complex[J]. *Nature*, 2009, 458: 1191-1195.

- [6] CHANG P C, WANG C J, YOU C K, et al. Effects of a HP0859 (rfaD) knockout mutation on lipopolysaccharide structure of *Helicobacter pylori* 26695 and the bacterial adhesion on AGS cells Po-Chun [J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2011, 405: 497-502.
- [7] KIM C H. A *Salmonella typhimurium* rfa mutant recovers invasiveness for human epithelial cells when complemented by wild type rfaE (controlling biosynthesis of ADP-L-glycero-D-manno-heptose-containing lipopolysaccharide) [J]. **Molecules and Cells**, 2003, 15(2): 226-232.
- [8] MA P, HU X Q, CHEN J Z, et al. The effect of the structure of lipopolysaccharide on the permeability of *Escherichia coli* cell membranes [J]. **Microbiology China**, 2011, 38(8): 1307-1315.
- [9] LAU P C Y, LINDHOUT T, BEVERIDGE T J, et al. Differential lipopolysaccharide core capping leads to quantitative and correlated modifications of mechanical and structural properties in *Pseudomonas aeruginosa* films [J]. **Journal of Bacteriology**, 2009, 191(21): 6618-6631.
- [10] KHEMALEELAKUL S, BAUMGARTNER J C, PRUKSAKOM S. Autoaggregation and coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections [J]. **Journal of Endodontics**, 2006, 32(4): 312-318.
- [11] FELEK S, LAWRENZ M B, KRUKONIS E S. The *Yersinia pestis* autotransporter YapC mediates host cell binding, autoaggregation and biofilm formation [J]. **Microbiology**, 2008, 154: 1802-1812.
- [12] MERRITT J, NIU G Q, OKINAGA T, et al. Autoaggregation response of *Fusobacterium nucleatum* [J]. **Applied and Environment Microbiology**, 2009, 75(24): 7725-7733.
- [13] PODLADCHIKOVA O, ANTONENKAB U, HEESEMANN J, et al. *Yersinia pestis* autoagglutination factor is a component of the type six secretion system [J]. **International Journal of Medical Microbiology**, 2011, 301: 562-569.
- [14] LIU Yuehua, ZHOU Guanglin. The selection of agglutinating nature yeast on alcohol fermentation [J]. **Liquor Making**, 2007, 3(2): 58-61. (in Chinese)
- [15] RACHMAN M A, NAKASHIMADA Y, KAKIAONO T, et al. Hydrogen production with high yield and high evolution rate by self-flocculated cells of *Enterobacter aerogenes* in a packed-bed reactor [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1998, 49: 450-454.
- [16] JANKOVIC I, VENTURA M, MEYLAN V, et al. Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2 [J]. **Journal of Bacteriology**, 2003, 185(11): 3288-3296.
- [17] HASMAN H, CHAKRABORTY T, KLEMM P. Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation [J]. **Journal of Bacteriology**, 1999, 181(16): 4834-4841.
- [18] SHERLOCK O, VEJBORG R M, KLEMM P. The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self-recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation [J]. **Infection and Immunity**, 2005, 73(4): 1954-1963.
- [19] ULETT G C, WEBB R I, SCHEMBRI M A. Antigen-43-mediated autoaggregation impairs motility in *Escherichia coli* [J]. **Microbiology**, 2006, 152: 2101-2110.
- [20] BENZ I M, SCHMIDT A. Structures and functions of autotransporter proteins in microbial pathogens [J]. **International Journal of Medical Microbiology**, 2011, 301(6): 461-468.
- [21] GIRARD V, COTE J P, CHARBONNEAU M E. Conformation change in a self-recognizing autotransporter modulates bacterial cell-cell interaction [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2010, 285(14): 10616-10626.
- [22] WANG Z, WANG J L, REN G, et al. Influence of core oligosaccharide of lipopolysaccharide to outer membrane behavior of *Escherichia coli* [J]. **Marine Drugs**, 2015, 13: 3325-3339.
- [23] WANG R F, KUSHNER S R. Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli* [J]. **Gene**, 1991, 100: 195-199.
- [24] ROUX A, BELOIN C, GHIGO J M. Combined inactivation/expression strategy to study gene function in physiological conditions: application to the identification of new adhesins in *Escherichia coli* [J]. **Journal of Bacteriology**, 2005, 187: 1001-1013.
- [25] DANESE P N, PRATT L A, DOVE S L, et al. The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms [J]. **Molecular Microbiology**, 2000, 37(2): 424-432.
- [26] VYAZMENSKY M, SELLA C, BARAK Z, et al. Isolation and characterization of subunits of acetohydroxy acid synthase isozyme III and reconstitution of the holoenzyme [J]. **Biochemistry**, 1996, 35(32): 10339-10346.
- [27] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. **Methods**, 2001, 25(4): 402-408.