

高产铁载体产生菌的筛选及其在发酵绿茶中的初步应用

李韵雅^{1,2}, 曹刚刚^{1,2}, 蔡宇杰^{1,2}, 廖祥儒^{*1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 铁载体在植物营养、诱导植物抗性及人体保健方面具有广泛的应用前景。利用 CAS 双层平板法从 69 株苏铁根际微生物中筛选出 8 株高产铁载体的芽孢杆菌, 经鉴定发现 8 株菌所产铁载体主要为儿茶酚盐型。综合考察 8 株芽孢杆菌铁载体的产量和发酵后绿茶感官特征, 最终筛选出一株两者俱佳的菌, 通过分子和生理生化鉴定、菌落形态比较初步鉴定为特基拉芽孢杆菌。最后对特基拉芽孢杆菌液态发酵产茶的条件进行优化。在 40 °C, 接种 0.5 mL/g, 发酵 5 d 时利用该菌发酵绿茶得到的茶叶口感、香气、色泽最佳。

关键词: 菌株筛选; 发酵优化; 绿茶; 铁载体; 特基拉芽孢杆菌

中图分类号: Q 815 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2018)06-0610-07

Isolation of Siderophore-Producing Microorganisms and Study on It's Application in Fermentation of Green Tea

LI Yunya^{1,2}, CAO Ganggang^{1,2}, CAI Yujie^{1,2}, LIAO Xiangru^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Siderophores have broad applications in plant nutrition, induction of plant resistance and human health-care. CAS double-layer plates were employed in order to select siderophore-producing microorganisms. Eight high-yield siderophore-producing *Bacillus* bacteria strains were selected from the 69 microorganisms which were isolated from roots of cycad. And their siderophores were mainly phenolates catecholates. Finally, a strain of high siderophore production was chosen, and it revealed to be *Bacillus tequilensis* by comparison of 16s rRNA. *Bacillus tequilensis* produced the best fermented green tea at 40 °C and inoculation volume of 0.5 mL/g after 5 d.

Keywords: strain isolation, fermentation optimization, green tea, siderophore, *Bacillus tequilensis*

收稿日期: 2015-08-29

基金项目: 江苏省产学研联合创新资金项目(BY2014023-28)。

* 通信作者: 廖祥儒(1964—), 男, 江西南康人, 农学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物化学和生物工程方面的研究。

E-mail: xrliao@jiangnan.edu.cn

引用本文: 李韵雅, 曹刚刚, 蔡宇杰, 等. 高产铁载体产生菌的筛选及其在发酵绿茶中的初步应用[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(06): 610-616.

茶含丰富营养物质,具多种保健功能,是一种广泛适用的饮品。茶叶中研究最多的几种生物活性成分有茶多酚(tea polyphenol)、茶多糖(tea polysaccharide)和咖啡碱(caffeine)。茶多酚是包括黄烷醇类、黄烷酮类、花色苷类和酚酸类等在内的约30多种含酚基的物质;黄烷醇类是茶多酚的主要存在形式,而儿茶素类化合物是黄烷醇类的主要成员,因此在茶叶中茶多酚大部分都以儿茶素的形式存在^[1]。茶多酚不仅是一种天然的抗氧化剂,还具有免疫调节、抗癌抗突变、抗动脉粥样硬化、抗辐射、防止糖尿病等广泛的生理功能。茶多糖主要包括葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、核糖、半乳糖、木糖及甘露糖等。茶多糖是一种水溶性复合多糖,相对分子质量约为 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$,茶叶中提取的茶多糖产品常含有少量的蛋白质、果胶等物质^[2]。茶多糖具有抗血栓、增强免疫功能、降血糖、降血脂、抗凝血等多种生物活性。茶叶中咖啡碱含量约占干物质量的2%~5%^[3]。咖啡碱能兴奋中枢神经系统,还可以起到解热镇痛、助消化、利尿的作用,广泛应用于医药、食品和化工行业。

虽然茶叶中这些物质功能多样,但是摄入过多则对健康不利,如茶多酚摄入过多会刺激胃部。发酵过程中茶多酚被氧化,茶叶本身的酚氨比降低、芳香物质增加,同时酚氨比的降低也可以增强茶汤口感的协调性^[4]。经过不同微生物发酵还可以改善茶的口感或风味,做成不同品种的发酵茶。细菌、霉菌和食用菌都可以应用于茶叶的发酵。在普洱茶研究中发现接种有益菌进行茶叶发酵有利于茶叶优良品质及特定风味的形成^[5-8]。也有研究人员采用多菌种混合发酵和不同菌种分阶段发酵的工艺。胡燕等^[9]以茶叶浸提液为主要基质,对用乳酸菌发酵茶饮料的加工工艺进行优化,在工艺条件优化后制得的茶饮料,既有茶的各种风味物质和营养成分,又增加了酸奶的营养成分,使其风味好、品质佳。江洁等^[10]采用乳酸菌和酵母菌进行两段发酵,发酵后茶汤既有乳酸菌饮料的风味和保健特征,又具酵母发酵的醇香。日本的发酵茶也是一种混菌多菌种分段发酵的茶饮料,其生产工艺是在茶饮料中先接种 *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Seopulariopsis brevicaulis*, 发酵一段时间后,茶叶基质中纤维素和果胶等被消化破坏,茶中营养物质易溶出,再接种 *Laetobacillus plantarum*, 继续发

酵,即制成了一种氨基酸含量较高的发酵茶饮料^[11]。

当处于低铁胁迫环境时,为了满足微生物生长对铁的需求,微生物能够分泌铁载体用以形成铁螯合物,以有效吸收自然中溶解度很低的铁^[12]。铁载体类型主要为羟氨酸盐型(hydroxamates)、儿茶酚盐型(phenolatescatecholates)和羧酸盐型(carboxylates)等。临床上,铁载体可用于铁中毒或作为毒力因子治疗细菌疾病,还能够与抗生素结合形成共轭化合物,从而将抗生素传递给细菌细胞^[13-15]。铁载体可以改善人体对铁的吸收,在健康保健方面具有广泛的应用前景。

作者研究的目的是筛选铁载体高产菌株,并将其应用到绿茶发酵,在实现常用的茶叶发酵菌株的改善茶叶品质的效果的同时提高发酵茶的营养价值。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器设备

1.1.1 主要材料 茶叶:市售低档绿茶;菌种:作者所在实验室保存的苏铁根际芽孢杆菌。

1.1.2 主要试剂 CAS(铬天青), FeCl_3 , CTAB(十六烷基三甲基溴化铵), 亚硝酸钠, 钼酸钠, 2,3-二羟基苯甲酸, NaOH, HCl 等试剂:购自国药集团;API 50 CHB 鉴定试剂条:购自生物梅里埃有限公司;细菌基因提取试剂盒:购自宝生物工程(中国)有限公司。

1.1.3 培养基 斜面培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0, 酵母膏 5.0, NaCl 10.0, 琼脂 15.0; pH 7.0。

CAS 双层平板:下层 10 mL CAS- Fe^{3+} -CTAB 固体检测液, CAS 浓度为 1 mmol/L, Fe^{3+} 浓度为 0.1 mmol/L, CTAB 浓度为 4 mmol/L, 琼脂 20 g/L; 上层 10 mL 固体 LB 培养基。

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0, 酵母膏 5.0, NaCl 10.0; pH 7.0。

KMB 培养基(g/L):甘油 9.0 mL, K_2HPO_4 2.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5, 酪蛋白氨基酸 5.5; pH 自然。

以上培养基均经过 115 °C 灭菌 20 min。

1.2 分析方法

1.2.1 菌种鉴定 采用 16S rRNA 基因序列分析法,按试剂盒说明提取细菌 DNA 并以通用引物 F27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 R1492 (5'-TACGGCTACCTTGTTA CG ACTT-3') 扩增细菌 16S rRNA 基因,纯化测序。

1.2.2 铁载体类型鉴定 铁载体类型鉴定 主要根据整合铁离子集团的不同及其与不同试剂的不同显色进行鉴定^[16]。

1) 高氯酸铁实验: 取发酵上清液 0.5 mL 加入 2.5 mL 的高氯酸铁溶液, 若颜色变成红色或者橙色, 则说明发酵上清液中含有异羟肟酸类铁载体。

2) FeCl₃ 实验: 取发酵上清液 1 mL 加入 1~5 mL 2 g/L 的 FeCl₃ 溶液, 如果颜色变红或变紫说明有铁载体的存在。1 mL 上清液加入 1 mL FeCl₃ 溶液立即变红的, 则为异羟肟酸类铁载体, 1 mL 上清液加入多于 1 mL FeCl₃ 溶液, 溶液变红或变紫, 则为儿茶酚类铁载体。

3) Arnow 实验: 取发酵上清液 1 mL, 依次加入 1 mL 0.5 mol/L 盐酸, 1 mL 钼酸盐溶液, 若上清液中存在儿茶酚型铁载体, 则溶液中的亚硝酸分解, 生成黄色 NO 配体, 溶液颜色变黄。

钼酸盐溶液配制: 称取硝酸钠 10 g 与钼酸钠 10 g 溶解于 100 mL 蒸馏水中。

因为亚硝酸在溶液中的分解迅速不利于黄色配体的生成, 因此在溶液中加入钼酸钠, 可使亚硝酸分解减慢。钼酸钠加入后还可提高显色的亮度达 15 倍。

加入 1 mol/L 的氢氧化钠溶液 1 mL, 若含有儿茶酚类铁载体, 则颜色变红, 而且至少能够保持一个小时不变色。

1.2.3 铁载体浓度测定 实验方法依据参考文献^[16]采用 Arnow 实验进行定量, 方法略有改动。

标准曲线绘制: 配置 1 mmol/L 的 2,3-二羟基苯甲酸溶液。将其分别稀释使浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mmol/L。取上述各浓度梯度的 2,3-二羟基苯甲酸溶液 1 mL 于试管中, 依次加入 1 mL 0.5 mol/L 盐酸, 1 mL 1 mol/L 钼酸钠溶液, 1 mL 1 mol/L 氢氧化钠溶液, 混合均匀, 静置 1 h, 检测 OD₅₁₅。

取 1 mL 发酵上清液, 加入 1 mL 0.5 mol/L 盐酸, 1 mL 1 mol/L 钼酸钠, 1 mL 1 mol/L 氢氧化钠, 混合均匀, 静置 1 h, 检测 OD₅₁₅。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种筛选 CAS 平板初筛: 将实验室保存的 69 株苏铁根际芽孢杆菌分别接种到 LB 平板, 30 °C 培养 3 d。挑取菌落接种到 CAS 双层平板, 继续在 30 °C 培养 3 d。

铁载体高产株筛选: 选取 CAS 双层平板中变色圈大的菌株作为初筛菌株, 接种到 LB 培养基中 30 °C 培养 3 d 得到种子液。按体积分数 1% 接种种子液至 50 mL KMB 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 3 d。离心得到上清液。再用 Arnow 实验测定铁载体的浓度。选取产高铁载体的菌株接种斜面保存。

1.3.2 茶叶的品鉴 茶叶的感官评价根据国家标准 GB/T 23776-2009 《茶叶感官审评方法》中普通(大宗)绿茶的评审方法执行。茶的品鉴得分根据下式(1)计算得出(单项满分 100 分):

$$\text{总得分} = A_1 \times 20\% + A_2 \times 10\% + A_3 \times 30\% + A_4 \times 30\% + A_5 \times 10\% \quad (1)$$

式中, A₁ 为外形得分, A₂ 为汤色得分, A₃ 为香气得分, A₄ 为滋味得分, A₅ 为叶底得分。

1.3.3 绿茶发酵条件优化 发酵温度与时间是影响发酵茶品质的主要因素^[17-18], 而本实验中菌种为新的外加菌种, 所以选取温度、接种量和时间 3 个条件进行优化。

发酵温度和接种量: 每瓶放入 5 g 茶叶, 选取发酵温度和接种量 2 个因素做正交实验, 因素和水平见表 1, 发酵 7 d 后进行感官评价。

表 1 L₉(3²) 正交优化设计因素水平表

Table 1 Orthogonal design

水平	因素	
	温度/°C	接种量/(mL/g)
1	30	0.3
2	40	0.4
3	50	0.5

发酵时间的优化: 取 5 g 绿茶, 接种 2.5 mL 种子液后于 40 °C 培养 7~13 d, 品鉴茶叶。

2 结果与分析

2.1 菌种筛选和鉴定

2.1.1 CAS 双层平板初筛 铁载体结合 CAS-Fe³⁺-CTAB 蓝色复合物中的 Fe³⁺, 复合物解体平板显现出 CAS 原有的黄色^[19]。故可根据平板变色圈的大小判断菌株是否产生及产铁载体能力的强弱。取自苏铁根部的土壤涂板得到 69 株菌, 接种 69 株菌到 CAS 平板, 得到 8 个能够产生铁载体的菌株, 编号分别为: 11, 15, 36, 50, 86, 142, 168, 169, 见图 1。

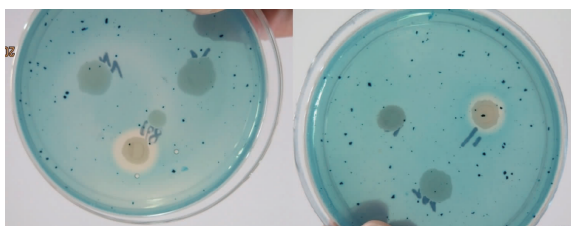


图1 CAS 双层平板初筛结果

Fig. 1 Isolation of strains on CAS plates

2.1.2 初筛菌种产铁载体类型鉴定 初筛得到的8株菌的铁载体类型检测结果见表2,可知其主要产生的铁载体类型为儿茶酚盐型。

表2 铁载体类型检测结果

Table 2 Siderophore type test results

菌株	高氯酸铁实验	FeCl ₃ 实验	Arnow 实验
11	-	NS	+
15	-	儿茶酚	++
36	-	儿茶酚	+++
50	-	儿茶酚	+
86	-	儿茶酚	+
142	-	NS	++
168	-	儿茶酚	++
169	-	儿茶酚	+++

注:表中 NS 表示反应不明显不能确定主要铁载体类型。

2.1.3 茶叶发酵初试及产铁载体能力检测 上述8个菌株接种种子液到茶叶进行固态发酵,然后对发酵茶进行感官评审;接种菌株到 KMB 培养基发酵后测定铁载体浓度,结果见表3。

表3 初筛菌株茶叶发酵初试结果及产铁载体能力检测结果

Table 3 Tea fermentation test and produce siderophores test results of the frist screenedStrains

菌株	茶叶品鉴得分	铁载体浓度/(mmol/L)
11	68	0.876
15	72	2.070
36	84	4.748
50	76	0.609
86	56	0.849
142	70	1.591
168	64	2.013
169	70	3.425

品鉴不同菌株发酵后茶叶的品质,得到15、36、142、169四株菌发酵后茶叶品质较好,都在70分以上。36、169两株菌铁载体产量较高。综合不同菌株

发酵后茶叶感官和铁载体产量,选取36号菌为后续实验菌株。

2.1.4 菌种鉴定 16S rRNA 基因鉴定,将测得序列进行 BLAST 比对,根据结果,取序列相似度较高的模式菌株,使用 Clustalx1.81 和 MEGA 4.0.2 软件采用邻接法(Neighbor-Joining method)进行聚类分析和系统进化树构建,结果见图2。目的菌株36的16S rRNA 基因序列与芽孢杆菌属特基拉细菌的16S rRNA 基因序列最为接近。

菌36平板菌落形态如图3所示,其菌落较小,白色不透明,边缘光滑,表面呈伞状凸起,较粘稠、易挑取。目的菌糖发酵生理生化鉴定见表4。目的菌初步鉴定为细菌界、硬(或厚)壁菌门、芽孢杆菌纲、芽孢杆菌目、芽孢杆菌科、特基拉芽孢杆菌属。

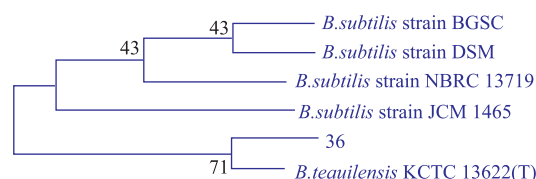


图2 基于16S rRNA 基因序列对目的菌株构建的系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of the target strain based on its 16S rRNA gene analysis



图3 目的菌平板菌落形态

Fig. 3 Colony morphology on plate of the target strain

2.2 绿茶发酵优化

2.2.1 发酵温度和接种量 茶叶发酵温度和接种量的正交实验结果见表5。可知,温度对茶叶感官的影响大于接种量。接种量加大时细菌发酵产生的酸臭味增加,但这种酸臭味在干燥过后并不明显。温度升高可去除茶叶中部分杂味,但高温长时间发酵有可能给茶叶带来焦糊味,影响茶叶香气和口感。此次优化实验得到发酵温度40℃、接种量0.5 mL/g时发酵茶感官评价最高。发酵后茶汤苦涩味减少,口感协调性增加。

表 4 API 50 CHB 试剂盒对应底物及目的菌反应

Table 4 The substrates corresponding to API 50 CHB kits and the strain reaction

序号	底物	目的菌反应
0	对照	-
1	甘油	+
2	赤藓醇	-
3	D-阿拉伯糖	-
4	L-阿拉伯糖	+
5	核糖	+
6	D-木糖	-
7	L-木糖	-
8	阿东醇	-
9	β -甲基-D-木糖甙	-
10	半乳糖	-
11	葡萄糖	+
12	果糖	+
13	甘露糖	+
14	山梨糖	-
15	鼠李糖	-
16	卫茅醇	-
17	肌醇	+
18	甘露醇	+
19	山梨醇	+
20	α -甲基-D-甘露糖甙	-
21	α -甲基-D-葡萄糖甙	+
22	N-乙酰-葡萄糖胺	-
23	苦杏仁甙	+
24	熊果甙	+
25	七叶灵	+
26	柳醇	+
27	纤维二糖	+
28	麦芽糖	+
29	乳糖	-
30	蜜二糖	+
31	蔗糖	+
32	海藻糖	+
33	菊糖	+
34	松叁糖	-
35	棉子糖	+
36	淀粉	+
37	肝糖	+
38	木糖醇	-
39	龙胆二糖	+
40	D-松二糖	-
41	D-来苏糖	-
42	D-塔格糖	-
43	D-岩糖	-
44	L-岩糖	-
45	D-阿拉伯糖醇	-
46	L-阿拉伯糖醇	-
47	葡萄糖酸盐	+
48	2-酮基-葡萄糖酸盐	-
49	5-酮基-葡萄糖酸盐	-

表 5 茶叶发酵温度与接种量正交实验分析表

Table 5 Orthogonal experiment analysis table of fermentation temperature and inoculum

	温度/°C	接种量/(mL/g)	感官品鉴分数
实验 1	30	0.30	65
实验 2	30	0.40	72
实验 3	30	0.50	74
实验 4	40	0.30	87
实验 5	40	0.40	85
实验 6	40	0.50	85
实验 7	50	0.30	79
实验 8	50	0.40	84
实验 9	50	0.50	86
均值 1	70.333	77.000	
均值 2	85.667	80.333	
均值 3	83.000	81.667	
极差	15.334	4.667	

2.2.2 发酵时间 发酵茶感官分数在第 5 天时最高,这时茶叶口感浑厚淳正,无苦涩味;香气怡人,杂味极少;色泽红亮澄清;叶底舒展较快,形状完整。茶汤中铁载体浓度因为发酵过程中多酚类物质的降解而降低。

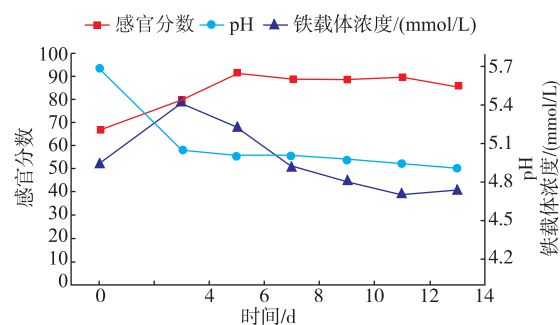


图 4 不同发酵时间茶叶指标

Fig. 4 Indicator diagram of tea with different fermented time

3 结语

“渥堆”发酵是熟茶(后发酵茶)加工的特定加工工艺,渥堆的实质是一个多种微生物参与的固态发酵过程,是茶品质形成的关键,微生物在其中起到极其重要的作用,目前采用专用菌曲生产熟茶已成为一种趋势^[20]。本实验中,将筛选的一株特基拉芽孢杆菌应用到茶叶固态发酵,有效改善了茶叶的风味,尤其在茶叶香气方面,发酵后的茶获得了淡淡果香,且茶叶品质易再现。说明应用有益微生物进行可控发酵,可达到稳定茶叶品质形成独特风味的

目的^[21-22]。目的菌株具有分泌铁载体的功能,有报道显示铁载体在再灌注损伤、铁粒幼细胞贫血、铁过载心肌病等疾病的治疗和肝细胞保护等人体保健方面具有潜力^[23-25],但其对于发酵茶的保健效果是否增加仍需进一步验证。本研究中所用菌种是从苏铁根际菌中筛选得到的,属芽孢杆菌属。有研究证明多种芽孢杆菌在普洱茶发酵渥堆过程中起到至关重要的作用,也有将芽孢杆菌分离作为单菌种接种发酵茶^[26-28]。虽然芽孢杆菌属细菌能广泛应用于食品工业中^[29],但本研究中发酵产品安全性仍有待进一步验证。

作者对目的菌株进行了 16S rRNA 和糖发酵生理生化指标的研究,初步鉴定该菌为芽孢杆菌属中的特基拉芽孢杆菌。在铁载体产量分析上,CAS 试剂配制中加入的 CTAB 对菌体生长有抑制作用^[30],

故作者采用的 CAS 双层平板使菌体利用上层 LB 培养基进行生长,而细菌所分泌的铁载体进入下层形成明显的变色圈,较参考文献[16]中的通用 CAS 平板更有利于对铁载体产量的判断。根据不同菌种生长需求常采用双层平板法或添加其他营养物质对通用 CAS 平板检测方法进行改进^[31-32]。铁载体不仅可给产生菌自身提供可利用的铁源,过量的铁载体还能形成相对高铁浓度的小环境,有利于可利用同源铁载体的植物的生长,并抑制某些不能利用其铁载体的细菌(如病原菌)的生长^[33-34]。由于铁载体也能螯合其他多种重金属,铁载体产生菌也常用来研究其对土壤改善的作用^[35]。因此该菌种还具有被应用于植物促生、病原菌的防治及土壤改善等方面的潜力。

参考文献:

- [1] GONG Changsheng. Extraction and application of tea polyphenol[J]. **Modern Chemical**, 1999(3) : 14-16. (in Chinese)
- [2] WANG Xuerong, DENG Shanggui, KAN Jianquan. Research progress on tea polysaccharide[J]. **Journal of Cereals & Oils**, 2006(6) : 43-46. (in Chinese)
- [3] ZHAO Z Y, HUANGFU L T, DONG L L, et al. Functional groups and antioxidant activities of polysaccharides from five categories of tea[J]. **Industrial Crops and Products**, 2014, 58: 31-35.
- [4] 连红茹. 灵芝发酵绿茶提高绿茶茶汤品质的研究[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2008.
- [5] WEN Qiongying, LIU Suchun. The change of microbial population during the pile fermentation of black tea[J]. **Tea Science**, 1991, S1: 10-16. (in Chinese)
- [6] ZHAO Longfei, ZHOU Hongjie. Study on the main microbes of Yunnan puer tea during pile-fermentation process[J]. **Journal of Shangqiu Teachers College**, 2005(2) : 129-133. (in Chinese)
- [7] LIANG Mingzhi. Yunnan pu-er tea can be trusted to drink[J]. **Guangdong Tea**, 2003(6) : 22-23. (in Chinese)
- [8] ZHAO Feilong, ZHOU Hongjie. Preliminary study on function of yeast in developing Puer tea quality[J]. **Gametea**, 2003(2) : 4-6. (in Chinese)
- [9] HU Yan, CHEN Zhongjie. Optimization of the processing technology of fermented lactic acid bacteria beverage containing the extract from tea[J]. **Journal of Anhui Agri**, 2011, 39(13) : 7703-7704, 7707. (in Chinese)
- [10] JIANG Jie, LIU Xiaolan, XUE Zhenlei, et al. The development of lactic acid bacteria and yeast symbiotic fermented tea drink[J]. **Food Science**, 2001, 22(1) : 44-46. (in Chinese)
- [11] SANAE O, NAOTO T, NAOHIRO O, et al. Microorganisms involving in the fermentation of Japanese fermented tea leaves. II. microorganism in the fermentation of Goishi-cha, Japanese fermented tea leaves[J]. **Nippon Shokuhain Kogaku Kishi**, 1996, 43(9) : 1019-1027.
- [12] DATTA B, CHAKRABARTTY P K. Siderophore biosynthesis genes of *Rhizobium* sp. isolated from *Cicer arietinum* L[J]. **Biotech**, 2013, 4(4) : 391-401.
- [13] KINZEL O, TAPPE R, GERUS I, et al. The synthesis and antibacterial activity of two pyoverdins-ampicillin conjugates, entering *Pseudomonas aeruginosa* via the pyoverdins-mediated iron uptake pathway[J]. **Antibiot (Tokyo)**, 1998, 51(5) : 499-507.
- [14] HENNARD C, TRUONG Q C, DESNOTTES J F, et al. Synthesis and activities of pyoverdins-quinolone adducts: a prospective approach to a specific therapy against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. **Med Chem**, 2001, 44(13) : 2139-2151.
- [15] PORAS H, KUNESCH G, BARRIERE J C, et al. Synthesis and in vitro antibacterial activity of catechol-spiramycin conjugates[J].

- Antibiot**, 1998, 51(8):51786-51794.
- [16] SCHWYN B, NEILANDS J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. **Anal Biochem**, 1987, 160(1):47-56.
- [17] ZHU Chen, ZHAO Shanshan, WANG Zhong, et al. The present situation and prospect of black tea fermentation technology[J]. **Journal of Anhui Agri**, 2015, 43(18):383-384, 387. (in Chinese)
- [18] LIN Fuming, SUN Weijiang. The research progress of quality influencing factors of black tea[J]. **China Tea**, 2012, 34(3):6-7. (in Chinese)
- [19] LOUDEN B C, HAARMANN D, LYNNE A, et al. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection[J]. **Journal of Microbiology & Biology Education**, 2011, 12(1):51-53.
- [20] LI Yali, BI Ming, WEI Zhenzhen, et al. Application of *Candida parapsilosis* GPT-5-11 for pu-erh tea fermentation[J]. **Journal of Tea Science**, 2013(5):436-442. (in Chinese)
- [21] CHEN Jichen, ZHENG Yongbiao, LIN Xinjian, et al. Ames test and quality evaluation of *Ganoderma lucidum* fermented Olong tea[J]. **Journal of Fujian Agriculture and Forestry University**, 2004, 33(3):333-335. (in Chinese)
- [22] ZHEN Yongbiao, LIN Xinjian, CHEN Jichen, et al. The safety test of hericium-erinaceus-fermentated-tea and the primary report of ITS on gastric acid secretion of the SD rats[J]. **Modern Povention Medicine**, 2003, 30(5):620-621. (in Chinese)
- [23] HORWITZ L D, SHERMAN N A, KONG Y, et al. Lipophilic siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* prevent cardiac reperfusion injury[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1989, 95(9):5263-5268.
- [24] ATESKAN U, MAS M R, YASAR M, et al. Deferoxamine and meropenem combination therapy in experimental acute pancreatitis[J]. **Pancreas**, 2003, 27:247-252.
- [25] OBEJERO-PAZ C A, YANG T, DONG W Q, et al. Deferoxamine promotes survival and prevents electrocardiographic abnormalities in the gerbil model of iron-overload cardiomyopathy[J]. **Lab Clin Med**, 2003, 141:121-130.
- [26] YAO Jing, CHEN Di, ZHEN Xiaoyan, et al. Isolation and molecular identification of the bacterial colonization during the pile fermentation process of Pu-er tea[J]. **Journal of Anhui Agri**, 2013, 41(6):2667-2668. (in Chinese)
- [27] LI Chenchen, LV Jie, YANG Ruijuan, et al. Isolation and identification of thermophilic bacteria during the pile-fermentation of Pu'er tea[J]. **Journal of Beijing University of Chemical Technology: Natural Science**, 2012, 39(2):74-78. (in Chinese)
- [28] YANG Xiaoping, LUO Jianfei, LIU Xin, et al. Microbial community structure and change during solid fermentation of Pu-er Tea [J]. **Food Science**, 2013, 34(19):142-147. (in Chinese)
- [29] WANG Zhen, HE Zhiyong, CHEN Jie, et al. Research on the potential application of *Bacillus coagulans* on probiotics candy production[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2012, 38(6):66-69. (in Chinese)
- [30] WANG Weixing, ZHOU Xiaolun, LI Zhongling, et al. Detection of siderophore production from hydrogen-oxidizing bacteria with CAS overlay plate method[J]. **Microbiology**, 2014, 41(8):1692-1697. (in Chinese)
- [31] CHEN Shaoxing, ZHAO Xiang, XIE Zhiyong, et al. Detection of siderophore from halophilic archaea with two-layer plate[J]. **Microbiology**, 2008, 35(1):142-144. (in Chinese)
- [32] TIAN Fang, DING Yanqin, ZHU Hui, et al. Screening, identification and antagonistic activity of a siderophore-producing bacteria G-229-21T from rhizosphere of tobacco[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2008, 48(5):631-637. (in Chinese)
- [33] LIU X, YANG G M, GUAN D X, et al. Catecholate-siderophore produced by As-resistant bacterium effectively dissolved FeAsO and promoted *Pteris vittata* growth[J]. **Environmental Pollution**, 2015, 206(1):376-381.
- [34] SUN Lei, SHAO Hong, LIU Lin, et al. Diversity of siderophore-producing endophytic bacteria of *Cymbidium goeringii* roots[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2011, 51(2):189-195. (in Chinese)
- [35] BRAUD A, JEZEQUEL K, BAZOT S, et al. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria[J]. **Chemosphere**, 2009, 74(2):280-286.