

产漆酶细菌的筛选、鉴定及产酶条件的初步优化

范晶晶¹, 张言周¹, 张永¹, 毛飞君², 李韵雅¹,
江威¹, 管政兵¹, 蔡宇杰¹, 廖祥儒^{*1}

(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. 金坤生物工程有限公司, 江苏 无锡 214131)

摘要: 从甘蔗渣滤泥中筛得一株具有漆酶活性的细菌 SYBC starX, 通过 16S rRNA 基因序列分析, 并结合生理生化实验及形态学观察, 鉴定为考克氏菌属(*Kocuria*); 利用液态发酵法研究了碳源、氮源、金属离子对其发酵产漆酶的影响, 确定菌株 SYBC starX 的最优碳源为 15 g/L α -乳糖, 最佳氮源为 40 g/L 大豆蛋白胨, 最适铜离子和锰离子的浓度分别为 3 mmol/L 和 0.4 mmol/L。

关键词: 漆酶; 鉴定; 考克氏菌

中图分类号: Q 81 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)06—0660—07

Screening and Identification of Laccase-Producing Bacterial Strain and Preliminary Optimization of Fermentation Conditions

FAN Jingjing¹, ZHANG Yanzhou¹, ZHANG Yong¹, MAO Feijun², LI Yunya¹,
JIANG Wei¹, GUAN Zhengbing¹, CAI Yujie¹, LIAO Xiangru^{*1}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. Jinkun Bio-Technology Company, Wuxi 214131, China)

Abstract: A strain with laccase activity, which was screened from bagasse filter mud, was named as SYBC X1. On the basis of its 16S rRNA gene-sequencing analysis, morphological observation, physiological and biochemical tests, the strain of bacteria X1 was classified as the genus of *Kocuria*. The effects of carbon sources, nitrogen sources and metal ions on laccase production were studied by liquid fermentation. The optimal carbon source was α -lactose (15 g/L) and the optimal nitrogen source was soy peptone (40 g/L). The concentrations of cupric ion and manganese ion were optimized as 3 mmol/L and 0.4 mmol/L, respectively.

Keyword: laccase, identification, *Kocuria*

漆酶(Laccase, E.C.10.3.2)可以利用分子氧作为电子受体氧化多种酚类化合物及非酚类的化合物, 将分子氧还原为水, 是一类环境友好酶。其在纸浆漂白、废水处理、食品加工、生物电池、免疫检测、新

能源等领域有着巨大的应用潜力^[1]。自然界中漆酶广泛存在于多种植物^[2]、昆虫、真菌和细菌中, 但研究和应用最广泛的漆酶多来源于担子菌、子囊菌等真菌, 尤以白腐真菌最为突出^[3-5]。但大多数真菌漆

收稿日期: 2014-12-19

基金项目: 江苏省产学研前瞻项目(BY2014023-28); 无锡市科技发展农业支撑项目(CLE01N1310)。

* 通信作者: 廖祥儒(1964—), 男, 江西南康人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生化与分子生物学研究。E-mail: liaoxiangru@163.com

酶最适 pH 一般偏酸,这严重限制了其应用领域^[6]。因此产漆酶细菌的筛选、酶学特性研究及应用受到越来越多研究者的关注。

目前,已在诸如生脂固氮螺菌、单胞菌属、苜蓿中华根瘤菌、链霉菌属、芽孢杆菌属及大肠杆菌等细菌中发现细菌漆酶的存在^[7]。而在应用方面,以芽孢杆菌属漆酶研究较多,其中枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的漆酶 CotA 已研究得较为清楚, CotA 较真菌漆酶拥有较高的最适 pH(pH7~8)及较好的耐热性^[8]。但芽孢杆菌漆酶一般存在于芽孢壁中,提取成本较高,不利于在生产中的应用,因此筛选能够产胞外漆酶的细菌,对于扩大细菌漆酶的应用具有十分重要的意义。作者从甘蔗制糖滤泥中筛选到一株具有较高胞外漆酶活性的细菌,经鉴定为考克氏菌(*Kocuria*),并对其产酶条件进行了初步的优化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 广西某制糖厂制糖后的甘蔗渣滤泥。

1.1.2 主要试剂 愈创木酚及 DMP, 购于 Sigma (St. Louis, MO) 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、质粒小量抽提试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒, 购自上海生工公司; 大肠杆菌 JM109 感受态细胞、16S rRNA 基因测序引物、Taq 酶、pMD18-T 载体, 购自 TaKaRa 公司; 其他常规试剂均为分析纯, 购自国药集团。

1.1.3 培养基

1) NB 培养基(g/L): 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0; pH 7.2~7.4。

2) NB 斜面培养基(g/L): 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 琼脂 20.0; pH 7.2~7.4。

3) 愈创木酚琼脂培养基: 含质量分数 0.04% 愈创木酚的营养琼脂培养基。

4) 种子培养基(g/L): 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0; pH 7.2~7.4。

5) 发酵基础培养基(g/L): 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.5; pH 7.0。

1.2 实验方法

1.2.1 产漆酶细菌的筛选 1) 产漆酶细菌的初筛: 将 10 g 甘蔗渣滤泥加入含 0.2 mmol/L $CuSO_4$ 的

NB 培养基中, 混匀, 30 ℃、200 r/min 振荡培养 24 h, 将培养液梯度稀释至 10^{-6} 后, 涂布于含 0.2 mmol/L $CuSO_4$ 的愈创木酚琼脂培养基平板上, 37 ℃ 培养 48 h。挑取有红色显色圈的菌落进行多次划线分离纯化, 并保存于 NB 斜面培养基, 4 ℃ 冰箱保存。

2) 产漆酶细菌的复筛: 用接种环挑取适量斜面保存菌株, 接入种子培养基(装液量 50 mL/250 mL), 30 ℃、200 r/min 摇床恒温培养 12 h, 取 1 mL 培养物作为种子液接入发酵基础培养基(装液量 50 mL/250 mL), 接种量为体积分数 2%, 30 ℃、200 r/min 摇床恒温培养 72 h, 将培养好的发酵液于 5 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为粗酶液, 测定其酶活力, 以活力高低作为复筛的依据。

1.2.2 漆酶活力测定 漆酶酶活测定以 DMP 为底物, 每 3 mL 反应体系含 0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 (pH 7), 0.01 mol/L DMP, 60 ℃ 保温 10 min 后加入 0.1 mL 酶液, 在分光光度计上 469 nm 处测吸光值。以每分钟氧化 1 μ mol 的 DMP ($\epsilon = 49.6$ L/(mmol·cm)) 所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位, 酶活性以 U/L 表示。数据处理以最大酶活为 100%^[9]。

1.2.3 菌种鉴定

1) 形态学和生理生化特征鉴定: 将待选菌株划线于 NB 固体(含 2 g/dL 琼脂)培养基, 在 30 ℃ 下培养 2 d, 利用电子显微镜观察菌株的细微形态。根据《伯杰细菌手册》和《常见细菌鉴定手册》中的方法测定其生理生化特性^[10]。

2) 16S rRNA 序列分析鉴定及系统进化树的构建: 利用基因组 DNA 提取试剂盒提取筛选菌株的基因组 DNA, 利用细菌 16S rRNA 通用引物(27F/1492R)进行 PCR 扩增, 将扩增产物与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 经蓝白斑筛选及菌落 PCR 得到阳性克隆, 提取质粒并送往上海生工生物技术公司测序。将所得 16S rRNA 序列进行 Blast 同源比对分析, 选取高同源性序列, 利用 MEGA4.0 软件构建系统发育树。系统发育树的构建采用邻接法(Neighbor-Joining method), 并重复取样 1 000 次进行自展值(bootstrap value)分析, 以评估系统发育树的置信度, 确定菌种在进化过程中的位置。

1.2.4 发酵产酶条件的初步优化

1) 碳源的优化: 将发酵基础培养基中的牛肉膏

替换成等物质的量的葡萄糖、果糖、马铃薯淀粉、可溶性淀粉、麦芽糖、蔗糖和 α -乳糖, 培养 72 h 后离心收集上清液测漆酶活性; 在发酵基础培养基中加入不同含量的最适碳源 (5、10、15、20、30、40、50、60 g/L), 在相同培养条件下发酵完后测漆酶活性。

2) 氮源的优化: 将发酵基础培养基中的胰蛋白胨替换成等物质的量的大豆蛋白胨、鱼粉蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉膏、粉状和膏状酵母提取物, 培养 72 h 后离心收集上清液测漆酶活性; 在发酵基础培养基中加入不同质量浓度的最适氮源 (5、10、15、20、30、40、50 g/L), 在相同培养条件下发酵完后测漆酶活性。

3) 金属离子的优化: 将发酵培养基培养 0 h 和 24 h 后分别加入 0.5 mmol/L 的过渡金属离子 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} , 相同培养条件下发酵后测漆酶活性。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选

经过平板初筛, 发现一株橙色细菌, 编号为 SYBC starX (见图 1), 将其挑出在平板上划线分离并进行摇瓶复筛, 测得发酵液有漆酶活性, 酶活为 10.26 U/L, 收集发酵液菌体进行超声破碎, 将细胞破碎上清液进行非变性电泳 (Native-PAGE), 用 2,6-二甲氧基苯酚 (DMP) 和考马斯亮蓝分别进行染色, 经 DMP 染色后出现了红色 (见图 2), 从而可以确定该细菌确实具有漆酶活性。

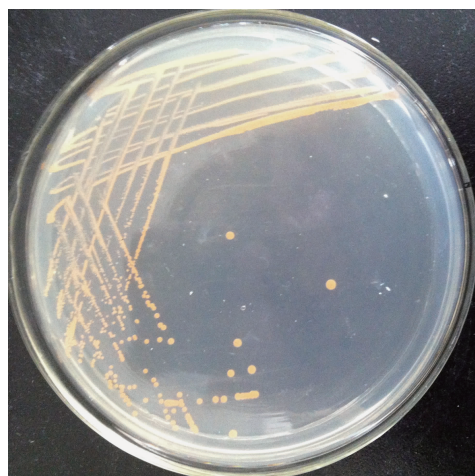


图 1 菌株 SYBC starX 的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of the strain SYBC starX

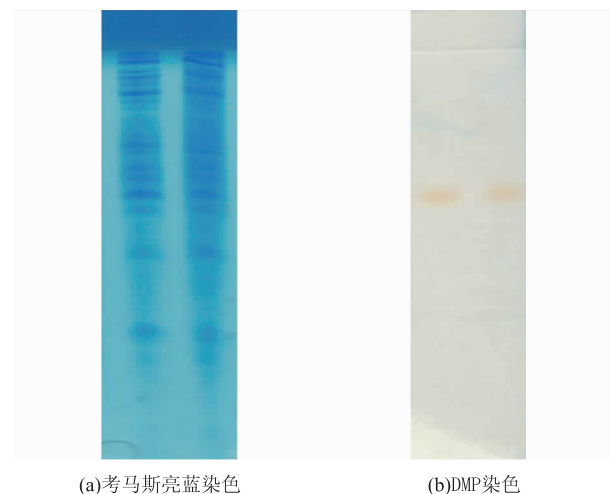


图 2 菌株 SYBC starX 细胞破碎上清液非变性蛋白质电泳图谱

Fig. 2 Native-PAGE of broken supernatant of the strain SYBC starX

2.2 菌种鉴定

2.2.1 系统进化树构建 对细菌 starX 进行 16S rRNA 基因扩增、测序并与 GenBank 数据库中其他微生物的 16S rRNA 基因序列进行了比对, 其中与 *Kocuria rosea* DSM 20447^T 菌株的相似度达到了 99%。取序列相似度较高的菌株, 通过 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, 结果如图 3 所示。目的菌株 SYBC starX 的 16S rRNA 基因序列与 *Kocuria* 属细菌的 16S rRNA 基因序列最为接近, 但与 *Kocuria* 属的其他种之间的亲缘关系不是很接近。因此将其鉴定为: 细菌界、放线菌门、放线菌纲、微球菌目、考克氏菌属; 并将其命名为 *Kocuria* sp. SYBC starX。

2.2.2 菌体形态观察和生理生化鉴定 鉴定该菌株为革兰氏阳性细菌, 不产孢子, 不能运动, 在营养琼脂培养基上, 菌落表面光滑, 呈橙红色、圆形、稍凸、不透明, 结果见上图 1。生理生化实验结果见表 1, 其中第 1 列数据来源于本研究, 2—6 列数据参考 Stackebrandt 等人的研究^[11-15]。从表 1 中可以看出, *Kocuria* sp. SYBC starX 与同一属的其他种的菌还是有区别的。

2.3 发酵产酶条件的初步优化

2.3.1 碳源对 *Kocuria* sp. X1 产漆酶的影响 如图 4 所示, 考察了 7 种碳源对 *Kocuria* sp. SYBC starX 发酵产漆酶的影响。

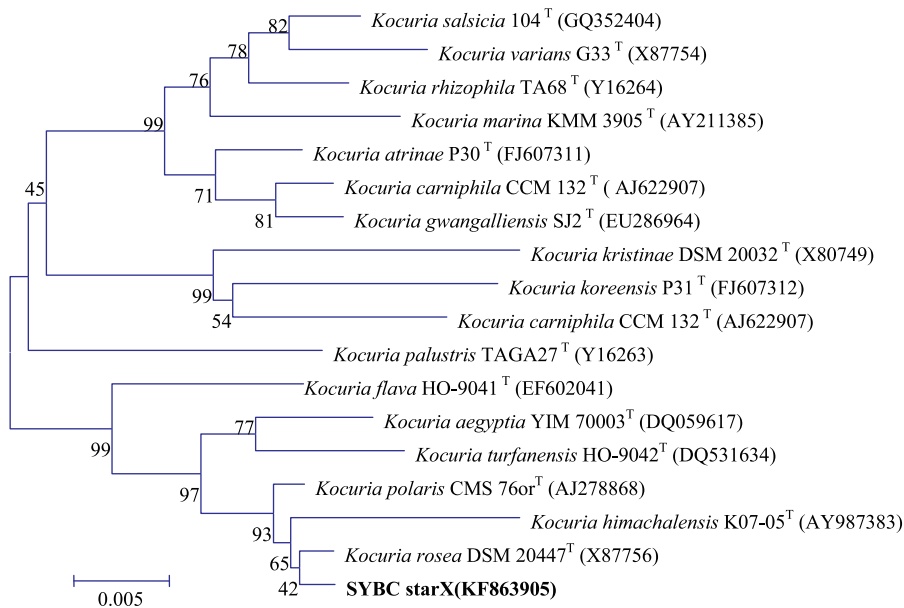


图 3 基于 16S rRNA 基因序列对目的细菌构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the target strain based on its 16S rRNA gene analysis

表 1 生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics

生理生化实验	1	2	3	4	5	6
菌落颜色:	粉色/橙色	橙色/红色	橙红色	橙色	粉色	橙色/红色
生长实验:						
5 °C	—	—	—	+	ND	ND
37 °C	+	+	+	—	+	+
0 g/dL NaCl	+	+	+	+	—	+
5 g/dL NaCl	+	+	+	—	+	+
7.5 g/dL NaCl	+	+	+	—	—	+
硝酸盐还原	+	+	—	+	—	W
H ₂ S 实验	—	—	—	ND	—	ND
V-P	—	—	—	—	—	—
M-R.	—	ND	—	—	—	—
吡嗪	—	—	—	—	—	—
脲酶	—	—	ND	—	—	—
接触酶	+	+	+	+	+	+
氧化酶	+	+	—	+	—	—
明胶水解	—	—	—	—	—	—
酪氨酸水解	+	ND	—	ND	—	ND
淀粉水解	+	+	—	+	—	+
柠檬酸盐利用	+	—	—	+	ND	ND
糖发酵:						
D-葡萄糖	+	+	+	+	—	ND
甘露糖	+	—	+	—	—	ND
乳糖	—	—	—	+	ND	ND
海藻糖	W	—	+	W	—	ND

续表 1

生理生化实验	1	2	3	4	5	6
蔗糖	+	–	–	+	ND	ND
半乳糖	+	–	–	+	ND	ND
麦芽糖	+	+	+	ND	–	ND
木糖	+	–	–	+	ND	ND
L-阿拉伯糖	–	+	–	–	ND	ND
D-甘露醇	+	+	+	+	ND	ND
D-果糖	+	ND	ND	+	+	ND
D-山梨醇	+	–	–	ND	–	ND
L-鼠李糖	W	–	+	+	ND	ND
DNA G+C 摩尔分数/%	72.17	70.2	75.3	72.3	73	65

注：+ Positive reaction；– Negative reaction；W：weak reaction；ND：data not available；1. *Kocuria* sp.SYBC starX；2. *Kocuria rosea* DSM 20447^T；3. *Kocuria himachalensis* K07-05^T；4. *Kocuria polaris* CMS 76or^T；5. *Kocuria aegyptia* YIM 70003^T；6. *Kocuria turfanensis* HO-9042^T。

α -乳糖是 *Kocuria* sp. SYBC starX 发酵产漆酶的最适碳源,其次是可溶性淀粉。以葡萄糖为碳源时,菌体浓度最高,但产酶却很低。通过进一步添加不同质量浓度的 α -乳糖,结果如图 5 所示,当 α -乳糖质量浓度为 15 g/L 时最有利于发酵产酶,所产漆酶酶活为 40.77 U/L。因此确定 α -乳糖为最优碳源,其质量浓度为 15 g/L。

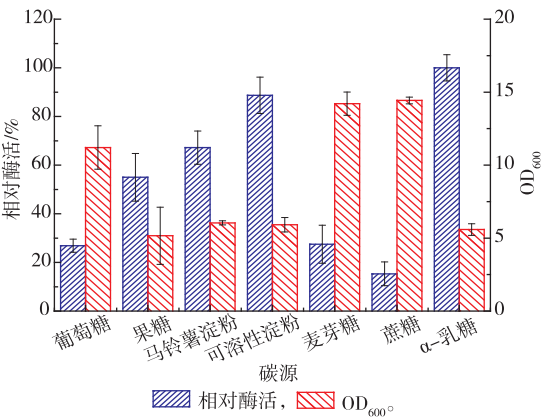


图 4 碳源对 *Kocuria* sp. SYBC starX 产漆酶的影响
Fig. 4 Effect of carbon sources on laccase production of *Kocuria* sp.SYBC starX

2.3.2 氮源对 *Kocuria* sp.X1 产漆酶的影响 如图 6 所示,在 6 种有机氮源中,以大豆蛋白胨为氮源时,*Kocuria* sp.SYBC starX 菌体浓度最高,且产酶最高,因此选择大豆蛋白胨为最佳氮源。进一步优化了大豆蛋白胨的质量浓度,结果如图 7 所示,随着大豆蛋白胨质量浓度的升高,菌体浓度也随之升高,当大豆蛋白胨质量浓度达到 40 g/L 时,最有利

于产漆酶,漆酶酶活为 107.93 U/L,再增加其质量浓度,反而抑制了 *Kocuria* sp.SYBC starX 产酶。

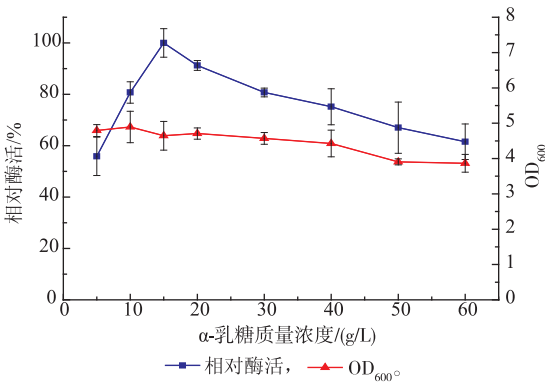


图 5 α -乳糖浓度对 *Kocuria* sp. SYBC starX 产漆酶的影响
Fig. 5 Effect of α -lactose on laccase production of *Kocuria* sp. SYBC starX

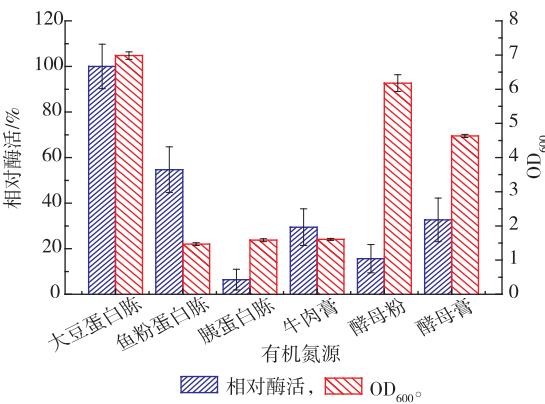


图 6 氮源对 *Kocuria* sp. SYBC starX 发酵产漆酶的影响
Fig. 6 Effect of organic nitrogen sources on laccase production of *Kocuria* sp. SYBC starX

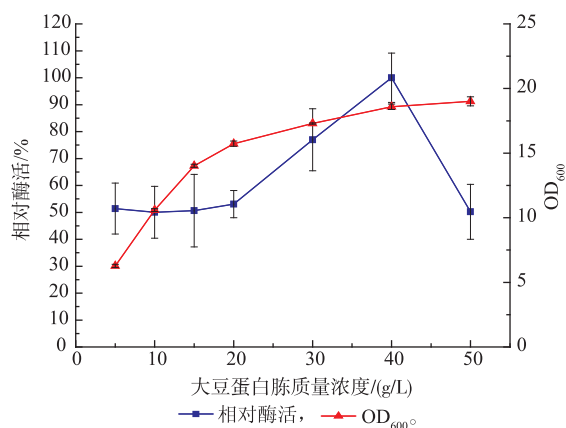


图7 大豆蛋白胨质量浓度对 *Kocuria* sp. SYBC starX 发酵产漆酶的影响

Fig. 7 Effect of soya peptone concentration on laccase production of *Kocuria* sp. SYBC starX

2.3.3 金属离子的影响 漆酶是一种金属酶,在酶分子结构中含有4个铜原子,因此重金属能提高酶的产量,在以上优化的基础上,考察了两种金属盐(硫酸铜、硫酸锰)对 *Kocuria* sp. SYBC starX 产漆酶的影响,结果见图8、图9。

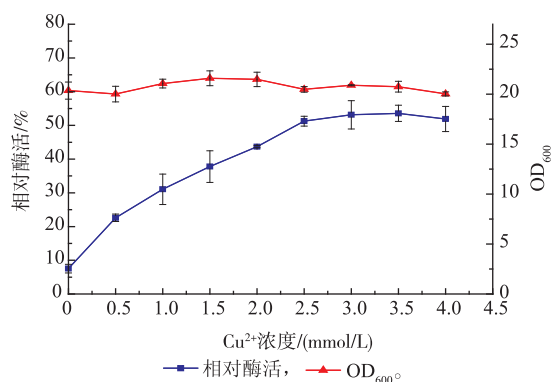


图8 铜离子对 *Kocuria* sp. SYBC starX 分泌漆酶的影响

Fig. 8 Effect of copper on laccase production by *Kocuria* sp. SYBC starX

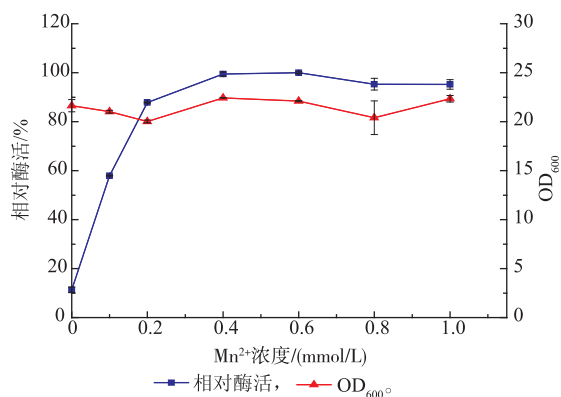


图9 锰离子对 *Kocuria* sp. SYBC starX 分泌漆酶的影响

Fig. 9 Effect of manganese on laccase production by *Kocuria* sp. SYBC starX

从图中分别可以看出,铜离子浓度为1.5 mmol/L、锰离子浓度为0.4 mmol/L时,最能刺激 *Kocuria* sp. SYBC starX 发酵产漆酶,酶活分别能达到140.77 U/L和263.44 U/L。

3 结语

通过筛选得到一株产漆酶的细菌 SYBC starX,经鉴定该细菌为 *Kocuria* 属,研究确定了 *Kocuria* sp. SYBC starX 具有产漆酶的能力,其液态发酵最适产酶碳源为 α -乳糖 15 g/L;氮源为大豆蛋白胨 40 g/L。发现铜离子和锰离子能刺激 *Kocuria* sp. SYBC starX 产酶,其最适浓度分别为 1.5 mmol/L 和 0.4 mmol/L。细菌生长的代时短,所需营养成分简单易得,便于大规模培养;大多数细菌生长在碱性环境中,筛选出最适 pH 在碱性范围内的细菌漆酶,可以直接用于处理工业废水;细菌漆酶对热、卤素和碱的稳定性好,漆酶活性的最适 pH 范围广泛,这些优点都是真菌漆酶所无法比拟的。因此,产漆酶细菌的筛选和发酵初步优化研究,对漆酶应用领域的扩展具有重要的意义。

参考文献:

- [1] Riva S. Laccases: Blue enzymes for green chemistry[J]. *Trends in Biotechnology*, 2006, 24(5): 219-226.
- [2] Nina H, Laura-Leena K, Kristiina K, et al. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site[J]. *Nature Structural Biology*, 2002, 9(8): 601-605.
- [3] 王志新,蔡宇杰,廖祥儒,等. *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 18S rDNA 序列分析及其固态发酵水葫芦产漆酶的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35(8): 832-839.
- WANG Zhixin, CAI Yujie, LIAO Xiangru, et al. 18S rDNA sequence analysis of *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 and studies of laccase production on hyacinth solid-state fermentation[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2009, 35(8): 832-839. (in Chinese)
- [4] 孙啸,蔡宇杰,廖祥儒,等. 血红密孔菌 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 固态发酵水稻秸秆产漆酶及其对染料的脱色作用

- [J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(3): 240-249.
- SUN Xiao, CAI Yujie, LIAO Xiangru, et al. Laccase production under solid-state fermentation of rice straw by *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 and its decolorization of synthetic dyes [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(3): 240-249. (in Chinese)
- [6] 司静, 李伟, 崔宝凯, 等. 真菌漆酶性质、分子生物学及其应用研究进展[J]. 生物技术通报, 2011(2): 48-55.
- SI Jing, LI Wei, CUI Baokai, et al. Advances of research on characteristic, molecular biology and applications of laccase from fungi[J]. **Biotechnology Bulletin**, 2011(2): 48-55. (in Chinese)
- [7] Alexandre G, Zhulin I B. Laccases are widespread in bacteria[J]. **Trends Biotechnol**, 2000, 18: 41-42.
- [8] Hullo M F, Moszer I A. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase [J]. **Journal of Bacteriology**, 2001, 183: 5426-5430.
- [9] 刘文华, 蔡宇杰, 孙付宝, 等. 白腐菌 *Trametes hirsuta* SYBC-L19 液态发酵水葫芦产漆酶[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(12): 1252-1261.
- LIU Wenhua, CAI Yujie, SUN Fubao, et al. Study of *Trametes hirsuta* SYBC-L19 liquidstate fermentation for laccase production [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(12): 1252-1261. (in Chinese)
- [10] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 杰氏细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所伯杰细菌鉴定手册翻译组译. 北京: 科学出版社, 1984: 453-454.
- [11] Stackebrandt E, Koch C, Gvozdiak O, et al. Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen nov, *Nesterenkonia* gen nov, *Kytococcus* gen nov, *Dermaococcus* gen nov and *Micrococcus* Cohn 1872 gen emend [J]. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 1995, 45: 682-692.
- [12] Mayilraj S, Kroppenstedt R M, Suresh K, et al. *Kocuria himachalensis* sp nov, an actinobacterium isolated from the Indian Himalayas[J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2006, 56: 1971-1975.
- [13] Reddy G S N, Prakash J S S, Prabakar V, et al. *Kocuria polaris* sp nov, an orange-pigmented psychrophilic bacterium isolated from an Antarctic cyanobacterial mat sample [J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2003, 53: 183-187.
- [14] LI W I, ZHANG Y Q, Schumann P, et al. *Kocuria aegyptia* sp nov, a novel actinobacterium isolated from a saline, alkaline desert soil in Egypt[J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2006, 56: 733-737.
- [15] ZHOU G L, LUO X S, TANG Y L, et al. *Kocuria flava* sp nov and *Kocuria turfensis* sp nov, airborne actinobacteria isolated from Xinjiang, China[J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2008, 58: 1304-1307.

科技信息

澳新拟允许使用罗汉果提取物作为强力甜味剂

2016年5月3日, 据澳新食品标准局(FSANZ)消息, 经萨拉亚有限公司(Saraya Co., Ltd)申请, 澳新食品标准局发布通知公告 11-16, 拟批准 A1129 号申请, 允许使用罗汉果提取物(罗汉果苷)作为强力甜味剂用于烘焙等, 建议最大使用浓度为 8000mg/kg。

[信息来源] 厦门 WTO 工作站. 澳新拟允许使用罗汉果提取物作为强力甜味剂 [EB/OL]. (2016-5-5). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=51533>

欧亚经济联盟国家禁止生产添加香兰素的儿童食品

2016年4月5日, 据哈通社消息, 欧亚经济委员会决定, 自 2016年4月6日起, 禁止在儿童食品中使用乙基香兰素。在此之前生产的产品在有效期内可以合法销售, 包括在俄罗斯商店, 家长不必为此担心。

欧亚经委会表示, 目前世界趋势是在儿童食品中仅使用纯天然添加剂, 欧亚经济联盟也将遵循此规则。由于乙基香兰素为人工香精, 而儿童食品香精的添加仅限于安全和必要情况, 因此儿童食品中无需使用乙基香兰素, 可以使用香草替代。生产商有一定的过渡期, 以改变配方并避免使用有争议的香精。优化儿童食品的工作将会常态化, 相关指标通常每十年进行一次修订。

[信息来源] 珠海进出口公共技术服务平台. 欧亚经济联盟国家禁止生产添加香兰素的儿童食品 [EB/OL]. (2016-4-14). <http://www.ietsp.org/yujingxx/2641.jhtml>