

## Labiase

(細菌細胞壁溶解酵素)

### 特長

Labiaseは、*Streptomyces fulvissimus* TU-6 株の培養液上清より調製され、N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ、ムラミダーゼを主体とする複合酵素剤で、以下のような特徴が有ります。

1. 熱安定性に優れている。
2. N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ、ムラミダーゼ、エンドペプチダーゼ活性を有する。
3. 乳酸菌および、火落菌をはじめ、その他細菌類の細胞壁をよく溶解する。
4. 単独で乳酸菌のプロトプラストが調製できる。

### 規格

500 mg / バイアル

N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ活性 10 U / g 以上

### 形状

凍結乾燥粉末(賦形剤として乳糖を含む)

### 保存

4°C乾燥状態

### 諸性質

#### 1. 酵素特性

*Levilactobacillus brevis* IFO3345を基質とした溶菌活性<sup>※1</sup>にて温度およびpHの影響を評価した。

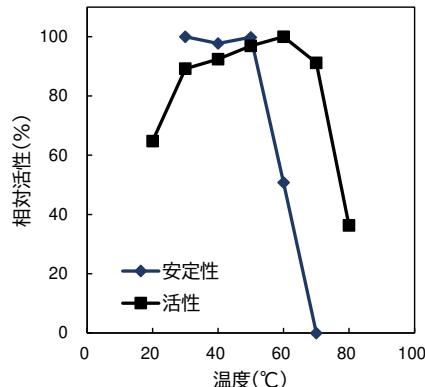


図1 温度—活性、安定性曲線

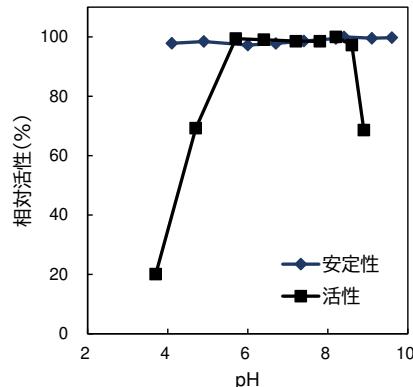


図2 pH—活性、安定性曲線

図1 安定性: pH<sup>※2</sup>を6.4に調製し各温度にて1時間保存したLabiaseを用いて、37°Cで1時間溶菌反応を行った際の溶菌率にて評価した。

活性: pH<sup>※2</sup>を6.4に調製し各温度で10分間溶菌反応を行った際の溶菌率にて評価した。

## 品番:OZ-30EX

図2 安定性: 各pH<sup>※2</sup>に調製し25°Cで20時間保存したLabiaseを用いて、37°Cで30分間溶菌反応を行った際の溶菌率にて評価した。

活性: 各pH<sup>※2</sup>にて37°Cで30分間溶菌反応を行った際の溶菌率にて評価した。

### ※1 溶菌活性の定義

基質懸濁液の濁度(OD<sub>660</sub>)の減少を溶菌率として測定した。

$$\text{溶菌率}(\%) = \frac{d_0 - d_t}{d_0} \times 100$$

d(0, t): 0, t hr後の反応後の濁度

### ※2 使用緩衝液: McIlvaine緩衝液 pH 3~8

ほう酸一水酸化ナトリウム緩衝液 pH 8~9

### 2. 溶菌スペクトル<sup>※3,※4</sup>

検定菌株	溶菌性
乳酸菌	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> IFO 3832	○
<i>Leuconostoc lactic</i> IFO 12455	○
<i>Enterococcus faecalis</i> IFO3971	△
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO 13951	○
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> IAM 1041	○
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> IFO 3533	○
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> IAM 1118	○
<i>Levilactobacillus brevis</i> IFO 3345	○
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> IFO 3071	○
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> IFO 3961	○
<i>Fructilactobacillus fructivorans</i> IFO 13954	○
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> JCM 1002	△
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> JCM 1012	△
<i>Lactobacillus helveticus</i> JCM 1120	○
<i>Lactobacillus helveticus</i> JCM 1005	○
<i>Lentilactobacillus kefiri</i> JCM 5818	○
<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i> JCM 5668	○
<i>Streptococcus thermophilus</i> IFO 13957	○
<i>Streptococcus mutans</i> JCM 5705	△
火落菌	
S4(火落性ホモ発酵型)	△
その他細菌	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> IFO12732	△
<i>Bacillus subtilis</i> ISW1214	○

○:溶菌率80%以上、△:溶菌率20~80%

### ※3 溶菌スペクトルの測定方法

対象菌体(いすれも対数増殖期)懸濁液の濁度( $OD_{660}$ )が1.0、酵素濃度が0.5%になるように、10倍希釈したMcIlvaine緩衝液(pH 6.0)で調製し、37°Cで2時間反応させた際の溶菌活性にて評価した。

### ※4 菌株の種類、培養条件等により溶菌率は変動します。

### 3. 各種酵素活性

酵素	活性(U/g-protein) <sup>※8</sup>
N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ <sup>※5</sup>	435
ムラミダーゼ <sup>※6</sup>	200,000
エンドペプチダーゼ <sup>※7</sup>	216

### ※5 N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ活性の定義

4-ニトロフェニル N-アセチル-β-D-グルコサミニドを基質として酵素を作用させたとき、1分間に1  $\mu\text{mol}$  の4-ニトロフェノールを遊離する酵素活性を1 Uとする。

### ※6 ムラミダーゼ活性の定義

*Micrococcus lysodeikticus* (ATCC No. 4698)菌体を基質として酵素を作用させたとき、1分間に濁度( $OD_{540}$ )を0.001減少させる酵素活性を1 Uとする。

### ※7 エンドペプチダーゼ活性の定義

カゼインを基質として酵素を作用させたとき、1分間に1  $\mu\text{mol}$  のチロシン相当量を生ずる酵素活性を1 Uとする。

※8 但し、各酵素活性はロットによって幅があります。また、ムラミダーゼ、エンドペプチダーゼの値は代表サンプル値であり、規格値ではありません。

### 4. 乳酸菌のプロトプラスト調製

検定菌株	プロトプラスト形成量(%) <sup>※9</sup>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> IFO 3832	75.4
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> IAM 1041	74.4
<i>Levilactobacillus brevis</i> IFO 3345	75.3

### ※9 乳酸菌のプロトプラスト調製方法

組成	濃度
乳酸菌菌体 (対数増殖期)	$OD_{660}=6.0$
スクロース (スタビライザー)	0.58 M
MgCl <sub>2</sub> (スタビライザー)	30 mM
McIlvaine緩衝液 (pH6.0)	10倍希釈
Labiase	1.5%

上記組成の反応液を調製し、37°Cで1時間反応後、スタビライザーを含まないMcIlvaine緩衝液(pH 6.0、10倍希釈)で反応液を10倍希釈してプロトプラストをバーストさせた時の濁度( $OD_{660}$ )と、スタビライザーを含むMcIlvaine緩衝液(pH 6.0、10倍希釈)で10倍希釈してバーストさせなかった時の濁度を測定した。また同時にコントロールとして酵素を除いて同様に調製したものを、スタビライザーを含むMcIlvaine緩衝液(pH 6.0、10倍希釈)で10倍希釈した時の濁度を測定した。プロトプラスト形成量は次式により求めた。

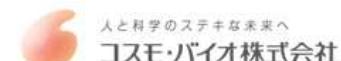
$$\text{プロトプラスト形成量(%)} = \left( \frac{\text{反応液をスタビライザーを含む緩衝液で反応液をスタビライザーを含まない緩衝液で}}{\text{10倍希釈したものの濁度}} - \frac{\text{コントロールを10倍希釈したもの濁度}}{\text{10倍希釈したものの濁度}} \right) \times 100$$

### 参考文献

- 1)長谷川和哉、大淵和彦、濱地正昭、熊谷知栄子 :公開特許公報, 平 11-056348
- 2)長谷川ら :平成 9 年度 日本生物工学会大会講演要旨集, p140

本商品は「研究用試薬」です。人や動物の医療用・臨床診断用・食品用としては使用しないように、十分ご注意ください。

### 販売元



〒135-0016 東京都江東区東陽2-2-20 東陽駅前ビル

URL : <https://www.cosmobio.co.jp/>

・ 営業部(お問い合わせ)

TEL : (03)5632-9610 FAX : (03)5632-9619

### 製造元



〒663-8227 兵庫県西宮市今津出在家町4番9号

TEL : 0798-32-2169

FAX : 0798-34-7475

URL : <https://www.ozeki.co.jp>

**Labiase**

(from *Streptomyces fulvissimus* TU-6)

**Labiase**, produced by a submerged culture of *Streptomyces fulvissimus* TU-6, is a new enzyme preparation that lyses effectively cell walls of numerous lactic acid bacterium. This preparation is used as a tool for studies of cell walls structure of lactic acid bacterium and the preparation of plasmid DNA, intracellular enzyme and protoplast from lactic acid bacterium and so on.

**SPECIFICATIONS :**

Appearance.....	Lyophilized powder (containing lactose)
Activity.....	≥ 10 units/g (N-Acetyl-β-D-glucosaminidase)
Optimum pH and temperature.....	See Fig. 1,2
pH and thermal stability.....	See Fig. 1,2

**ASSAY FOR N-ACETYL-β-D-GLUCOSAMINIDASE ACTIVITY :**
**Unit Definition**

One unit of enzyme catalyzes the release of 1 μmole of 4-nitrophenol from 4-nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide per minute at 37°C, pH 4.3.

**Method**
**Reaction mixture**

Substrate .....	5 mM 4-nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide in 10-fold diluted McIlvaine buffer, pH 4.3	0.95 mL
Enzyme .....	suitably diluted enzyme	0.05 mL
Total volume		1.00 mL

**Procedure**

After incubation for 10 minutes at 37°C, terminate by 2 mL of 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Read A<sub>405</sub>.

**Calculation**

$$\text{Enzyme unit} = \frac{A_{405} \times 3}{17.7 \times 10^3 \times 10} \times 10^3$$

The molar extinction coefficient of free 4-nitrophenol under these conditions is 17,700.

**ASSAY FOR LYtic ACTIVITY TOWARD BACTERIA:**
**Method**
**Reaction mixture**

Buffer .....	McIlvaine buffer, pH 6.0	0.1 mL
Substrate .....	Bacterial suspension(OD <sub>660</sub> ≈ 10)	0.1 mL
Enzyme .....	5% solution	0.1 mL
Distilled water		0.7 mL
		Total volume 1.0 mL

**Procedure**

(Before adding the enzyme solution, preincubation is carried out for 5 minutes at 37°C.) After incubation for 2 hours at 37°C with gentle shaking, OD<sub>660</sub> of the mixture is determined.

**Calculation**

$$\text{Percentage decrease in OD}_{660} = \frac{d_0 - dt}{d_0} \times 100$$

d(0 or t) : OD<sub>660</sub> of reaction mixture after 0 or t hours

**Result**

See Table 1.

The extent of lysis of bacterial cells by **Labiase** varies with bacterial strain, growth stage, or cultural condition.

**STORAGE :**

Lyophilized preparation is stable for at least 1 year when stored at 4°C.

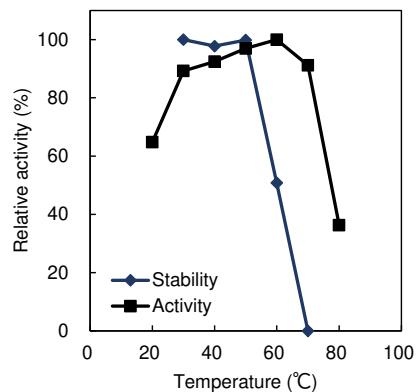


Fig. 1 Thermal-stability and activity toward  
*Levilactobacillus brevis* IFO3345

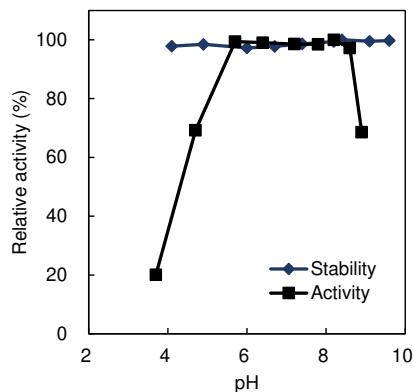


Fig. 2 pH-stability and activity toward  
*Levilactobacillus brevis* IFO3345

**Fig. 1 Stability:** The enzyme solution was adjusted to pH 6.4 and stored at each temperature for 1 hour. The lytic activity was evaluated after reacting at 37°C for 1 hour.

**Activity:** The lytic activity was evaluated after reacting at each temperature for 10 minutes at pH 6.4.

**Fig. 2 Stability:** The enzyme solution was adjusted to each pH and stored at 25°C for 20 hours. The lytic activity was evaluated after reacting at 37°C for 30 minutes.

**Activity:** The lytic activity was evaluated after reacting at 37°C for 30 minutes at each pH.

Table 1 Lysis of bacterial cells by Labiase

Strains	Lysis
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> IFO 3832	+
<i>Leuconostoc lactis</i> IFO 12455	+
<i>Enterococcus faecalis</i> IFO3971	±
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO 13951	+
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> IAM 1041	+
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> IFO 3533	+
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> IAM 1118	+
<i>Levilactobacillus brevis</i> IFO 3345	+
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> IFO 3071	+
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> IFO 3961	+
<i>Fructilactobacillus fructivorans</i> IFO 13954	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> JCM 1002	±
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> JCM 1012	±
<i>Lactobacillus helveticus</i> JCM 1120	+
<i>Lactobacillus helveticus</i> JCM 1005	+
<i>Lentilactobacillus kefiri</i> JCM 5818	+
<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i> JCM 5668	+
<i>Streptococcus thermophilus</i> IFO 13957	+
<i>Streptococcus mutans</i> JCM 5705	±
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> IFO12732	±
<i>Bacillus subtilis</i> ISW1214	+

Lysis rate: (+)  $\geq 80\%$ ,  $80\% > (\pm) \geq 20\%$

Please note that the above data is an example. The values vary widely depending on the condition.

To be used for research only. DO NOT use for human gene therapy or clinical diagnosis.

#### Distributor



2792 Loker Avenue West, Suite 101  
Carlsbad, CA 92010 USA  
URL : <https://www.cosmobiousa.com/>  
e-mail : [info@cosmobiousa.com](mailto:info@cosmobiousa.com)  
Phone : +1-760-431-4600  
Fax : +1-760-431-4604

#### Manufacture



4-9, Imazu Dezaike-Cho, Nishinomiya-Shi,  
Hyogo 663-8227 JAPAN  
TEL : +81-798-32-2169  
FAX : +81-798-34-7475  
URL : <https://www.ozeki.co.jp>