

## Labiase

Cat#OZ-30EX

(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..... $\geq 10$  units/g  
( $\beta$ -N-Acetyl-D-glucosaminidase)

Other activities contained  
Lysozyme..... $\geq 2 \times 10^4$  units/g  
Optimum pH and temperature.....See Fig. 1,2  
pH and thermal stability .....See Fig. 1,2

### ASSAY FOR $\beta$ -N-ACETYL-D-GLUCOSAMINIDASE ACTIVITY:

#### Unit Definition

One unit of enzyme catalyzes the release of  $1 \mu$  mole of *p*-nitrophenol from *p*-nitrophenyl N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide per minute at  $37^\circ\text{C}$ , pH4.0.

#### Method

##### Reaction mixture

Substrate.....5mM <i>p</i> -nitrophenyl N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide in 0.2M Citrate-phosphate buffer, pH 4.0	0.95 ml
Enzyme.....suitably diluted enzyme	0.05 ml
<b>Total volume</b>	<b>1.00 ml</b>

#### Procedure

After incubation for 10 minutes at  $37^\circ\text{C}$ , terminate by 2ml of 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Read  $A_{405}$ .

#### 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 *p*-nitrophenol under these conditions is 17,700.

### ASSAY FOR LYTIC ACTIVITY

#### TOWARD LACTIC ACID BACTERIUM:

#### Method

##### Reaction mixture

Buffer.....50mM Citrate -sodium citrate buffer, pH 4.0	1ml
Substrate...Lactic acid bacterium suspension( $A_{660} \doteq 5.0$ )	1ml
Enzyme.....500 $\mu$ g-protein/ml solution	1ml
Distilled water	2ml
<b>Total volume</b>	<b>5ml</b>

#### Procedure

(Before adding the enzyme solution preincubation is carried out for 5 minutes at  $37^\circ\text{C}$ .)After incubation for 2 hours at  $37^\circ\text{C}$  with gentle shaking,  $A_{660}$  of the mixture is determined. As a reference, 1 ml of distilled water is used instead of enzyme solution.

#### Calculation

$$\text{Percentage decrease in } A_{660} = \frac{(d_0 - dt) - (D_0 - Dt)}{d_0} \times 100$$

$d(0 \text{ or } t)$ :  $A_{660}$  of reaction mixture after 0 or 2 hours

$D(0 \text{ or } t)$ :  $A_{660}$  of reference mixture after 0 or 2 hours

## Result

See Table 1.

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

## STORAGE:

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

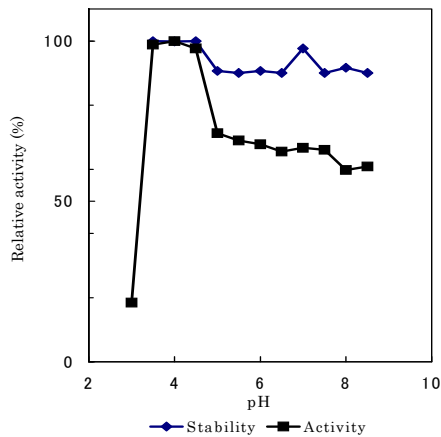


Fig.1 pH-stability and activity

Stability:18 hours treatment at 25°C

Activity:37°C

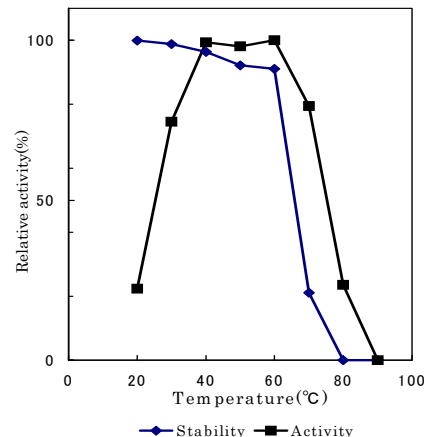


Fig.2 Thermal-stability and activity

Stability:10 minutes treatment

Activity:pH4.0

Table 1. Lysis of lactic acid bacterium cells by Labiase

Strains	Lysis (%)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> IFO 3832	92.8
<i>Leuconostoc lactis</i> IFO 12455	99.6
<i>Streptococcus faecalis</i> IFO 3971	96.5
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO 13951	97.9
<i>Lactobacillus plantarum</i> IAM 1041	96.8
<i>Lactobacillus casei subsp. casei</i> IFO 3533	59.4
<i>Lactobacillus casei subsp. ramosus</i> IAM 1118	91.8
<i>Lactobacillus brevis</i> IFO 3345	95.6
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3071	70.4
<i>Lactobacillus sp. (buchneri)</i> IFO 3961	89.4
<i>Lactobacillus fructivorans</i> IFO 13954	96.9
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> JCM 1002	97.7
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i> JCM 1012	92.0
<i>Lactobacillus helveticus</i> JCM 1120	98.7
<i>Lactobacillus helveticus</i> JCM 1005	84.5
<i>Lactobacillus kefir</i> JCM 5818	93.0
<i>Lactobacillus sanfrancisco</i> JCM 5668	82.1
<i>Bifidobacterium bifidum</i> JCM 1255	62.9
<i>Streptococcus salivaris subsp. thermophilus</i> IFO 13957	94.0
<i>Streptococcus mutans</i> JCM 5705	73.9

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

Manufacture:  OZEKI CORPORATION

Distributor



COSMO BIO Co., LTD.

Inspiration for Life Science

Suite 101, 2792 Loker Ave. W., Carlsbad, CA 92010, USA

<http://www.cosmobiousa.com>

e-mail : [info@cosmobiousa.com](mailto:info@cosmobiousa.com)

Phone : +1-760-431-4600

FAX : +1-760-431-4604

**Labiase**  
(乳酸菌細胞壁溶解酵素)

品番 : OZ-30EX

**特徴**

Labiaseは、*Streptomyces fulvissimus* TU-6株の培養液上清より調製され、β-N-アセチル-D-グルコサミンダーゼ、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あります。

1. 熱安定性に優れています。
2. 粉末、液体などの保存状態によらず安定である。
3. β-N-アセチル-D-グルコサミンダーゼ、ムラミダーゼ、エンドペプチダーゼ活性を有する。
4. 乳酸菌及び、火落菌をはじめ、その他細菌類の細胞壁をよく溶解する。
5. 単独で乳酸菌のプロトプラストが調製できる。

**規格**

500mg / バイアル

β-N-アセチル-D-グルコサミンダーゼ活性 10 U/g 以上

**形状**

凍結乾燥粉末 (賦形剤として乳糖を含んでいます)

**保存**

4°C 乾燥状態

**諸性質**

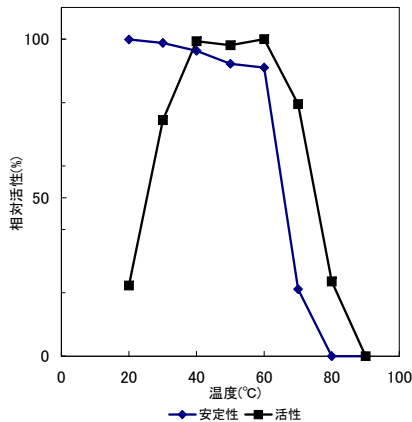


図1. 温度-活性、安定性曲線

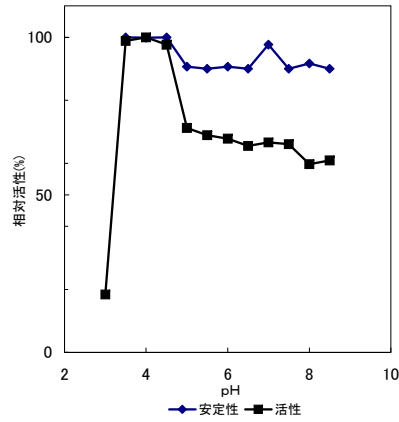


図2. pH-活性、安定性曲線

表1. 各種酵素活性

酵素	活性(U/g-protein)*4
β-N-アセチル-D-グルコサミンダーゼ**1	435
ムラミダーゼ**2	200,000
エンドペプチダーゼ**3	21

\*1 β-N-アセチル-D-グルコサミンダーゼ活性の定義

p-ニトロフェニル-β-N-アセチル-D-グルコサミンを基質として酵素を作用させたとき、1分間に1 μmolのp-ニトロフェニルを遊離する酵素活性を1 Uとする。

\*2 ムラミダーゼ活性の定義

*Micrococcus luteus* (IF03333) 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<sub>540</sub>) を0.001減少させる酵素活性を1 Uとする。

\*3 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 μmolのトリシン相当量を生ずる酵素活性を1 Uとする。

\*4 但し各酵素活性は、ロットによって幅があります。

表2. 乳酸菌に対する溶菌スペクトル

検定菌株	溶解率 (%)		
	Labiase	N-アセチルムラミダーゼ SG	7-α-D-グルコサミンダーゼ
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> IFO 3832	92.8	40.9	26.8
<i>Leuconostoc lactis</i> IFO 12455	99.6	98.7	18.6
<i>Streptococcus faecalis</i> IFO 3971	96.5	97.7	86.9
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO 13951	97.9	96.3	98.7
<i>Lactobacillus plantarum</i> IAM 1041	96.8	99.1	19.6
<i>Lactobacillus casei subsp. casei</i> IFO 3533	59.4	40.6	25.1
<i>Lactobacillus casei subsp. ramosus</i> IAM 1118	91.8	95.0	44.4
<i>Lactobacillus brevis</i> IFO 3345	95.6	95.5	71.3
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3071	70.4	63.7	59.8
<i>Lactobacillus sp. (buchneri)</i> IFO 3961	89.4	72.6	54.3
<i>Lactobacillus fructivorans</i> IFO 13954	96.9	98.7	48.3
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> JCM 1002	97.7	99.2	86.1
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i> JCM 1012	92.0	76.1	96.6
<i>Lactobacillus helveticus</i> JCM 1120	98.7	79.3	15.2
<i>Lactobacillus helveticus</i> JCM 1005	84.5	98.2	87.4
<i>Lactobacillus kefir</i> JCM 5818	93.0	89.7	41.3
<i>Lactobacillus sanfrancisco</i> JCM 5818	82.1	43.9	96.6
<i>Bifidobacterium bifidum</i> JCM 1255	62.9	87.0	41.8
<i>Streptococcus salivaris subsp. thermophilus</i> IFO 13957	94.0	91.7	40.9
<i>Streptococcus mutans</i> JCM 5705	73.9	38.1	81.7

表3. 火落菌に対する溶菌スペクトル

検定菌株 (発酵型)	溶解率 (%)		
	Labiase	N-アセチルムラミダーゼ SG	7-α-D-グルコサミンダーゼ
H1 (真性ヘテロ発酵型)	94.3	96.5	16.4
S14 (真性ヘテロ発酵型)	95.6	96.9	22.3
S24 (真性ホモ発酵型)	95.1	96.9	9.9
S42 (真性ホモ発酵型)	91.6	92.9	38.9
H34 (火落性ヘテロ発酵型)	89.2	68.9	18.6
S7 (火落性ヘテロ発酵型)	92.2	95.4	11.6
H7 (火落性ホモ発酵型)	95.6	96.5	21.6
S4 (火落性ホモ発酵型)	73.5	84.2	11.4

表4. その他細菌に対する溶菌スペクトル

検定菌株 (グラム染色)	溶解率 (%)		
	Labiase	N-アセチルアラミドイ SG	アクロモペプチダーゼ
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 12732 (陽性)	96.7	27.5	100.0
<i>Bacillus subtilis</i> ISW 1214 (陽性)	96.9	95.3	93.2
<i>E. coli</i> SSC-1 (陰性)	33.3	9.4	5.1
<i>Pseudomonas fluorescens</i> IFO 14160 (陰性)	95.8	6.8	0.0

\* 各細胞壁溶解酵素の溶菌スペクトルの測定方法

細胞壁溶解酵素の溶菌活性を菌体懸濁液の濁度の減少と見なし、以下の方法で濁度減少率を測定した。

対象菌体 (いずれも対数増殖期) 懸濁液の濁度 (OD<sub>660</sub>) が 1.0、酵素濃度が、100 μg-protein/ml に最終的になるように 0.01M ケン酸-ケン酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0) で調製し、37°C で 2 時間反応後の反応液の濁度を測定した。コントロールとして酵素を除いて同様に調製したものの濁度も、同様にして測定した。また N-アセチルアラミドイ SG (0.01M トリス-マリン酸-NaOH 緩衝液、pH5.5 中) およびアクロモペプチダーゼ (0.01M トリス-塩酸緩衝液、pH8.0 中) について同様に溶解率を測定した。溶解率は下式により求めた。

$$\text{溶解率 (\%)} = \frac{(d_0 - d_t) - (D_0 - D_t)}{d_0} \times 100$$

d (0, t) : 0, t hr 後の反応液の濁度  
D (0, t) : 0, t hr 後のコントロールの濁度

表5. 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 (%)*	
	Labiase	N-アセチルアラミドイ SG
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> IFO 3832	77.9	0.0
<i>Leuconostoc lactis</i> IFO 12455	89.8	0.0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO 13951	57.4	22.1
<i>Lactobacillus plantarum</i> IAM 1041	23.1	5.1
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i> JCM 1012	45.6	7.6
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i> JCM 1248	44.6	11.3
<i>Lactobacillus helveticus</i> JCM 1120	54.4	35.8
<i>Lactobacillus helveticus</i> JCM 1005	78.0	64.3
<i>Streptococcus salivaris subsp. thermophilus</i> IFO 13957	49.0	0.0

\* 乳酸菌のプロトプラスト調製方法

乳酸菌菌体 (対数増殖期) 懸濁液の濁度 (OD<sub>660</sub>) が、最終的に 6.0 になるように、0.6M KCl (スズライザー) を含む、0.01M ケン酸-ケン酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0) で調製したもの 1 容に対し、300 μg-protein/ml の酵素液を 1 容加えて 37°C で

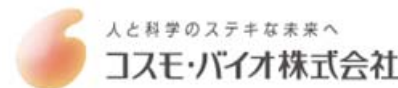
30 分間反応後、反応液をスズライザーを含まない 0.01M ケン酸-ケン酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0) で 10 倍希釈して、プロトプラストをバーストさせた時の濁度 (OD<sub>660</sub>) と、スズライザーを含む 0.01M ケン酸-ケン酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0) で 10 倍希釈してバーストさせなかった時との濁度を測定した。また同時にコントロールとして酵素を除いて同様に調製したものを、スズライザーを含まない 0.01M ケン酸-ケン酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0) で 10 倍希釈した時の濁度を測定した。プロトプラスト形成量は下式により求めた。

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

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

販売元



〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル  
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部 (お問い合わせ)  
TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619  
TEL : (03) 5632-9620

製造元

