

ラッカーゼの多孔質ポリビニルアルコール中空糸膜担体への 固定化とフェノール系化合物除去への応用

池井 清光・鈴木 綾乃*・中塚 大輔*・高倉 孝一**

岡山理科大学大学院理学研究科総合理学専攻

*岡山理科大学工学部応用化学科

**岡山理科大学技術科学研究所

(2004年9月30日受付、2004年11月5日受理)

I. 緒言

近年、環境問題に対する関心が高まる中、フェノール系化合物は広範囲の土壌や河川水に広がっており、深刻な問題となっている。また、その中にニルフェノールやビスフェノール A などの環境ホルモン(外因性内分泌攪乱物質)として疑われる化合物がある。最近、それらの化合物を酵素により分解する研究が数多く行われている。その中でも、酸化還元酵素であるラッカーゼ^{1,2}、チロシナーゼ³、ペルオキシターゼ^{4,5}によりクロロフェノール及びアルキルフェノール類の分解について検討されてきている。通常、粉体もしくは液体で供給される酵素は、使用する領域が制限されたり、酵素の回収方法が確立できていない現時点では効率も悪く多大な費用を要すると考えられる。そこで、酵素を適当な担体に固定化することにより、使用する領域の限定あるいは酵素回収の必要性がなくなり、ひいてはコスト低減が期待できる。また、固定化により酵素の安定性の向上、活性寿命の延長及び再利用など酵素単独の場合よりも有利になるといわれている⁶。

本研究では、担体として現在工業的水処理に使用されている超精密濾過膜である多孔質ポリビニルアルコール(PVA)中空糸膜⁷を用いて、酸化還元酵素のラッカーゼを様々な方法で固定化し、その固定化酵素の基質活性や保存安定性を検討し、環境浄化へ応用の可能性を探った。

II. 試料及び方法

1. 酵素

本研究に用いたラッカーゼは、木材腐朽菌であるヒイロタケ (*Pycnoporus coccolineus*)の液体培養により得られる、深青色の銅イオン含有酵素である。ラッカーゼの酵素溶液 [5mg/ml:10mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)] は(株)高研より購入した。このラッカーゼの性質を表1に示す。

表1. ラッカーゼの性質⁸⁾

分子量	約70,000	
等電点	pH 3.5	
至適pH	pH 4.0~5.0	
pH安定性	pH 4.0~pH 5.0(37°C,60min)	
熱安定性	≤60°C (pH 4.5~pH 5.0 10min)	
	アミノ酸組成	
塩基性アミノ酸	Lys(6個)	Arg(24個)
酸性アミノ酸	Asp(82個)	Glu(35個)
含硫アミノ酸	Cys(4個)	

2. 固定化用高分子膜担体

固定化担体には株式会社クラレから提供された超精密濾過用多孔質 PVA 中空糸膜(SF200H)を用いた。中空糸膜の形状は外径 1.0mm、内径 0.5mm、膜厚 0.25mm、孔径 $0.2\mu\text{m}$ であり、二官能性の架橋剤であるグルタルアルデヒド(GA)によりアセタール結合で架橋膜が形成されており、膜中には GA に由来する片末端アルデヒド基を $50\mu\text{mol/gHF}$ 含有している。

3. 試薬

膜のアミノ化学修飾剤にはエチレンジアミン(EDA)、ビス(3-アミノプロピル)アミン(Bis)[和光純薬工業株式会社]及びポリアリルアミン(PAA, Mw15,000)[日東硝子株式会社]を用いた。アミノ修飾膜の活性化試薬として、グルタルアルデヒド[和光純薬工業株式会社]、クロロメチルオキシラン(エピクロロヒドリン)[ナカライテスク株式会社]及び無水マレイン酸-ビニルエーテル共重合体(MAMEC, Mw20,000) [Scientific Polymer Products, Inc.]を用いた。また、基質にはカテコール(ピロカテコール)[和光純薬工業株式会社]、ビスフェノール A(BPA) (2,2-bis(p-hydroxyphenyl)propane)[和光純薬工業株式会社]及び 4-ノニルフェノール[東京化成工業株式会社]を用いた。

また縮合剤の 1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodiimide(EDC)は Aldrich Chemical Company Inc. より、還元剤のテトラヒドロホウ酸ナトリウム(NaBH_4)、アミノ基定量用試薬のトリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム(TNBS)は和光純薬工業株式会社より入手した。

タンパク質定量試薬の Micro BCA Kit は Pierce 社、カテコール定量試薬、4-Aminoantipyrine (4-AAP) は和光純薬工業株式会社、ビスフェノール A (BPA) ELISA Kit 及び、アルキルフェノール(AP) ELISA Kit は武田薬品工業株式会社より各々入手した。

実験方法

1. PVA 中空糸膜のアミノ修飾と活性化

(1)還元のアミノ化反応によるアミノ基の導入

メタノール抽出により精製した中空糸膜(5cm×10 本)を 1%アミン水溶液(EDA,PAA)5ml に浸漬し、30℃で 24 時間振盪して中空糸膜中の片末端残存アルデヒド基とアミノ基とを反応させた。この時生成する Schiff 塩基を還元するため、10ml の 2.5% NaBH_4 水溶液中、室温で 3 時間振盪した。次に、0.2 N HCl に気泡の発生が無くなるまで浸漬して還元剤を分解した後、0.1N NaOH により中和して超純水で一晩置換した。その後、超純水で 5 分間膜透過吸引洗浄を行い、超純水中で保存した。

(2)MAMEC による無水マレイン酸基(酸無水物)の導入

アミノ化した中空糸膜(5cm×10 本)をアセトンで置換した後、減圧乾燥し(室温、2 時間)水分を充分取り除いた。2%MAMEC/無水アセトン溶液(10ml)に浸し、室温で 2 時間振盪して、中空糸膜中のアミノ基と酸無水物とをアミド結合で共有結合させ、MAMEC をアミノ化膜に固定化した。次に、2%無水酢酸/無水アセトン溶液(10ml)中で、室温、2 時間振盪して未反応のアミノ基をアセチル化した。その後、付着している MAMEC 及び無水酢酸を無水アセトン(10ml)で室温、3 時間振盪して取り除き、減圧乾燥後保存した。

(3)アミノ化膜のアルデヒド基の導入

アミノ化中空糸膜(5cm×10 本)を 2.5%グルタルアルデヒド(GA)水溶液に浸し、30℃で 2 時間反応させた後、超純水で残存 GA を洗浄し、超純水中で保存した。

(4)アミノ化膜のエポキシ化

アミノ化中空糸膜(5cm×10 本)を 5%クロロメチルオキシラン(エピクロロヒドリン 99%含有)/0.6N NaOH 水溶液 5ml に浸し、30℃で 24 時間反応させた。反応後、超純水中に一晩置き、その後超純水で 5 分間膜透過吸引洗浄して、超純水中で保存した。

2. 活性化 PVA 中空糸膜へのラッカーゼの固定化

(1)縮合反応による固定化(縮合法)

0.5mg/ml 酵素溶液/EDC 水溶液を pH4.0、1.5ml にアミノ基導入中空糸膜(2.5cm×4 本)を浸して、30℃、24 時間、15rpm で反応させ、中空糸膜中のアミノ基と酵素中の酸性アミノ酸残基の側鎖カルボキシル基又は C 末端カルボキシル基とを縮合反応によるアミド結合で固定化した。その後、10mM リン酸ナトリウム

緩衝液(PB)(pH 7.4)で 10 分間、膜透過式吸引洗浄を行い、10mM PB (pH 7.4)中に保存した。

(2)酸無水物による固定化(MAMEC 法)⁹⁾

MAMEC 導入中空糸膜(2.5cm×4 本)を 0.5mg/ml 酵素溶液に浸し、30℃、15rpm で 24 時間反応させ、MAMEC 中の酸無水物と酵素の塩基性アミノ酸残基の側鎖アミノ基とのアミド結合生成により酵素を固定化した。その後、上と同様に洗浄を行い、10mM PB(pH 7.4)中に保存した。

(3)アルデヒド基による固定化(GA 化法)

アルデヒド基導入中空糸膜(2.5cm×4 本)を 0.5mg/ml 酵素溶液に浸し、30℃、15rpm で 24 時間反応させ、中空糸膜中のアルデヒド基と酵素のアミノ基とシッフ塩基を形成させて NaBH₄ で還元的アミノ化反応により固定化した。その後同様に洗浄を行い、10mM PB (pH 7.4)中に保存した。

(4)エポキシ基による固定化(エポキシ法)¹⁰⁾

エポキシ導入中空糸膜(2.5cm×4 本)を 0.5mg/ml 酵素溶液に浸し、30℃、15rpm で 24 時間反応させ、中空糸膜中のエポキシ環と、酵素のシステイン残基の SH 基と pH7.5 で反応させ、共有結合により固定化した。その後同様に洗浄を行い、10mM PB(pH 7.4)中に保存した。

3. アミノ基定量法¹¹⁾

Snyder らの TNBS 法に準じてアミノ化膜中の第 1 級アミンを測定した。アミノ基導入中空糸膜 0.5cm に、0.15mM TNBS/0.1M Na₂B₄O₇水溶液(pH 9.3)1ml を入れ 30℃で 6 時間反応させた後、反応上澄み液 0.5ml を 5.5×10⁻²M グリシン/0.1Na₂B₄O₇(pH 9.3)と反応させ、15 分以上放置した後、吸光度(420nm)を測定した。

4. 固定化酵素量の測定

固定化酵素の定量は MicroBCA(ピシコニン酸)タンパク質定量試薬を用いた。Pierce 社の取り扱い説明書に従い A 液 : B 液 : C 液 = 50 : 48 : 2 に調製した Micro BCA 呈色試薬(Micro BCA kit)0.5ml と超純水 0.5ml に酵素固定化中空糸膜 0.3cm を加え、60℃で 1 時間反応させた。これを室温に戻した後、吸光度(562nm)で測定した。検量線は BSA(ウシ血清アルブミン)を用いた。

5. 固定化酵素の活性の測定

固定化酵素活性は 4-アミノアンチピリン法¹²⁾によるカテコール酸化分解率により求めた。即ち、0.3mM カテコール水溶液 1ml に酵素固定化中空糸膜 0.3cm 入れ 30℃で反応させた。反応後、上澄み液 0.3ml を 4-アミノアンチピリン溶液 0.9ml に入れて、30℃、20 分間反応させた後、吸光度(515nm)により測定した。

6. ビスフェノール A 及びノニルフェノールの分解率の測定

固定化酵素の分解活性はビスフェノール A¹³⁾ 及びノニルフェノール¹⁴⁾のキットを用いて競合 ELISA 法により測定した。500 μg/ml の溶液に酵素固定化中空糸膜 0.5cm を入れ、30℃で反応させた。反応後、上澄み液を ELISA キットの測定法に従って、残存ビスフェノール A 及びノニルフェノール量を測定した。

III. 実験結果及び考察

1. アミノ基量の測定

表 2 に示すように、アミン修飾中空糸膜のアミノ基量は高分子アミンの PAA と低分子アミンの EDA では 2 倍以上の差がみられた。アミノ化中空糸膜に MAMEC、GA、エポキシにより反応性官能基を導入し活性化した。反応性官能基の導入については、各々の膜において高い転化率が得られた。本研究では転化率が高い PAA 化膜への MAMEC、GA、エポキシ活性化膜を中心にラッカーゼの固定化を行なった。

表 2. 活性化中空糸膜の官能基量

中空糸膜	転化率(%)
EDA (アミノ基量35.5 μmol/gHF)	
MAMEC	38.4
GA化	86.7
エポキシ化	77.4
PAA (アミノ基量91.6 μmol/gHF)	
MAMEC	73.7
GA化	88.7
エポキシ化	99.3

2. 固定化酵素量

図1に4通りの方法で固定化した固定化酵素量を示す。GA法以外はほぼ同様の固定化値を示した。縮合法型固定化法では、低分子アミンのEDAと高分子アミンのPAA化膜とでは、アミノ基量が2倍以上の差があるにも拘わらず酵素固定化量にはほとんど差は見られなかった。これは、酵素の固定化量がほとんど飽和に達しており、アミノ基密度の高いPAAでは反応にあずからないアミノ基がかなりある事を物語っている。又、高分子アミンのPAAはアミノ基密度が高く、酵素が多点多で結合するため、それが他の酵素の結合を阻害するためと考えられる。

3. 固定化酵素活性の測定

固定化酵素の活性として4-AAP法によりカテコールがキノン型に酸化される変換率の測定した結果を図2に示す。固定化量がほぼ同じ場合でもカテコール分解活性には固定化法により差が見られた。1時間後のカテコール変換率で固定化酵素と同等量のFree酵素と活性を比べると固定化酵素の活性は約50-60%に低下した。

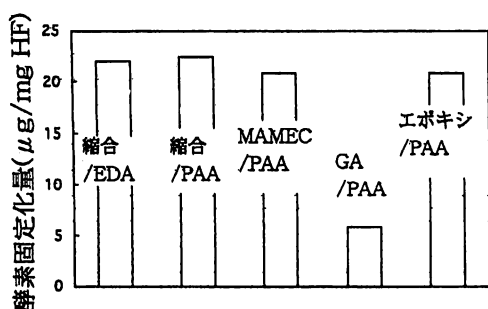


図1. 種々の膜の固定化酵素量。

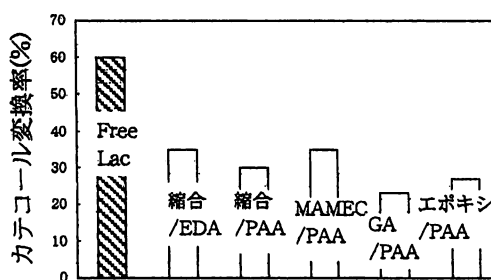


図2. 固定化酵素のカテコール変換率。

反応条件:

0.3mM カテコール/50mM 酢酸ナトリウム

buffer(pH 4.5) 30℃、1時間攪拌、浴比: 0.3cmHF/ml

4. カテコール変換率の反応時間変化

各種固定化酵素及びFree酵素のカテコール変換率の経時変化を図3に示す。Free酵素は初期に高い変換率を示していたが、時間の経過に伴い一定の値に飽和した。一方、固定化酵素はFree酵素に比べ、カテコール変換率が増加し、最後にはFree酵素と同等又はそれ以上の高い値を示した。

5. 固定化酵素活性のpHの影響

固定化酵素活性のpH依存性を図4に示す。固定化酵素はFree酵素に比べ至適pHが若干移動がみられたようである。一般に酵素固定化の担体をイオン性の担体を用いた場合、アニオン性担体では高pH側へ¹⁰、カチオン性担体では低pH側へ¹⁰それぞれ至適pHが移動するといわれており、その傾向は多少みられた。

6. 固定化酵素活性の熱安定性

固定化酵素を熱処理後、カテコールの分解率(1時間後)を測定した結果を図5に示す。一般に固定化酵素では熱安定性の向上が認められるが、今回の実験では活性の温度依存性はFree酵素とあまり変わらなかった。

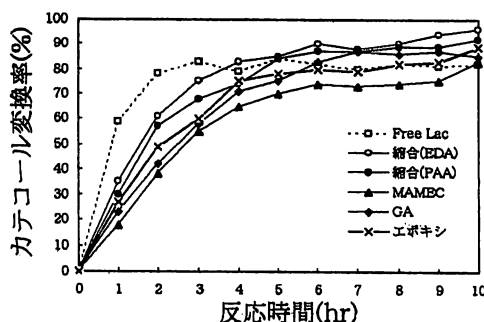


図3. カテコール変換率の反応時間変化。

反応条件:

図2と同じ、但し、反応時間を変化させた。

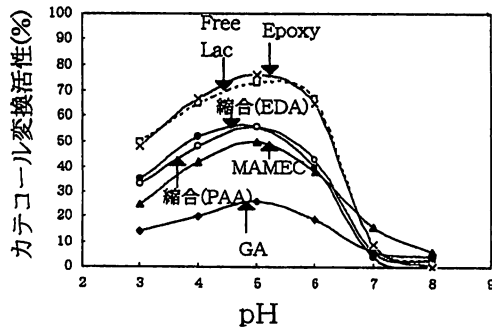


図 4. 固定化酵素のpH依存性.

反応条件:
図2と同じ、但し
0.3mMカテコール/50mMクエン酸-
2リン酸水素ナトリウム緩衝液中

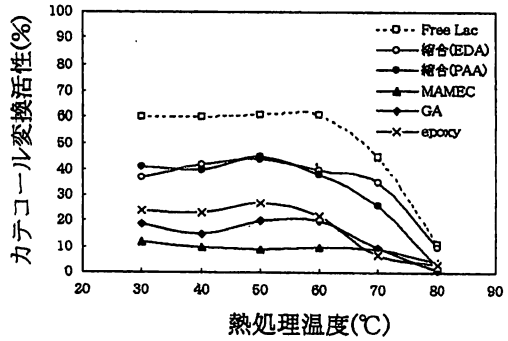


図 5. 固定化酵素の熱安定性.

熱処理条件:
1時間、10mMリン酸ナトリウム緩衝液中 (pH7.4)
反応条件:図2と同じ

7. 固定化酵素の繰り返し使用

繰り返し連続使用において酵素固定化中空糸膜を 1 回反応ごとに新しいカテコール溶液に入れ替え、カテコール変換率を測定した(図 6)。10 回の使用においても変換率の低下があまりみられず、固定化酵素の再利用が考えられる。しかし、反応に伴って膜は褐色に着色し分解生成物(重合体)の沈着がみられるため、分解活性にもバラツキが生じた。

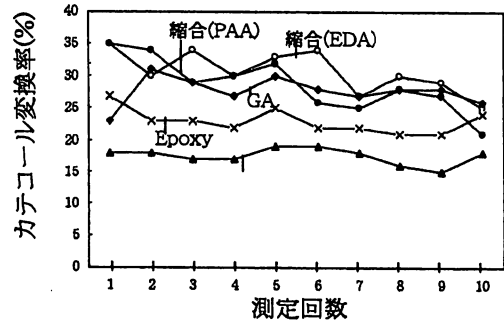


図 6. 酵素固定化膜の繰り返し連続使用の活性.

反応条件: 図2と同じ、但し反応毎に溶液を変えた。

8. 吸引濾過方式での固定化酵素活性の活性測定

縮合型酵素固定化中空糸(EDA、PAA 化)膜片 (5 cm 長) をシリンジに装着して吸引濾過方式での吸着実験を行った。先端を盲端型にした中空糸 (有効長、4.5cm) を 25ml シリンジに装着し、0.3mM カテコール/酢酸ナトリウム緩衝液に浸漬しながら吸引濾過し、反応後のシリンジ中の吸引液を 4-AAP 法に測定した値を図 7 に示す。また、繰り返し使用していくと、使用回数の増加に伴い、従来の浸漬法と同様に変換率が減少し、膜に着色した。

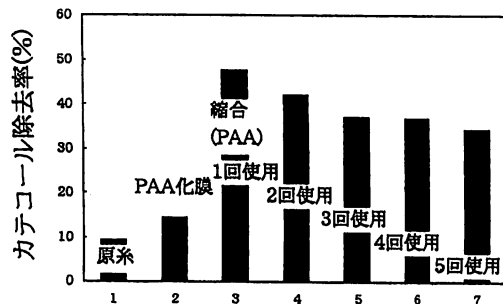
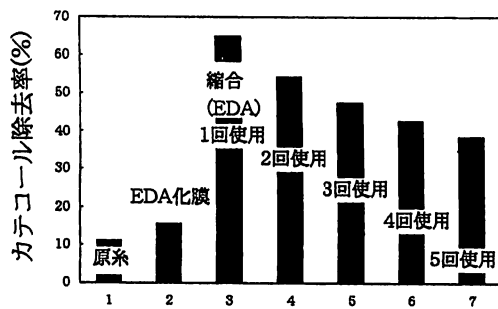


図 7. 吸引濾過方式でのカテコール除去率.

反応条件:
0.3mM カテコール/50mM 酢酸ナトリウムbuffer(pH 4.5)
吸引速度: 約1ml/min

9. 固定化酵素の保存安定性

固定化酵素量とカテコール分解活性の経日変化を図 8 に示す。いずれの固定化酵素膜においても固定化量の減少の傾向がみられたが、分解活性はあまり変化がなかった。4 通りの固定化法の中で特に MAMEC 法では固定化酵素量がかなり減少し、酵素の脱離がみられた。

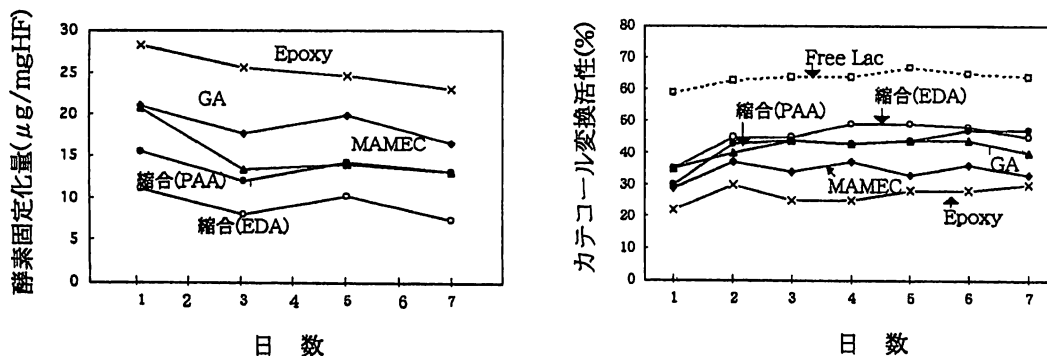


図 8. 固定化酵素量とカテコール変換率の経時変化。

保存条件:

30℃、10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)

1.5mlに振盪保存

1日毎に保存溶液を全交換した。

反応条件:

図2と同じ

10. ノニルフェノール及びビスフェノール A の分解

酵素固定化中空糸膜による分解活性を調べた結果、環境ホルモンとして疑われているビスフェノール A 及びにノニルフェノールに対しても活性が確認できた。ビスフェノール A の分解速度はカテコールに比べ遅かった為、ここでは酵素量を増加して(0.5cm HF)反応時間を延長して行なった(図 9、図 10)。

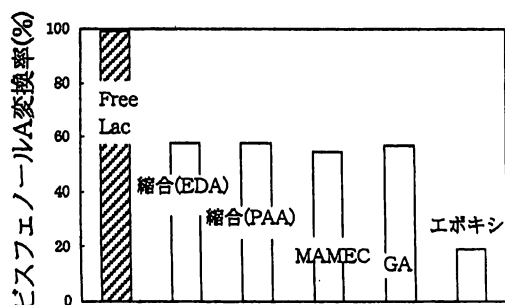


図 9. 酵素固定化中空糸膜によるビスフェノールAの変換活性。

BPAの分解条件

BPA濃度: 0.5mg/ml

浴比: 0.5cm/ml

30℃、3時間反応

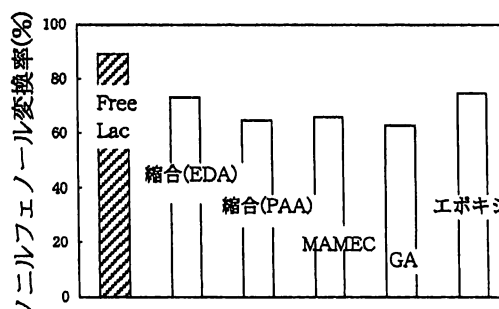


図 10. 酵素固定化中空糸膜によるノニルフェノールの変換活性。

ノニルフェノールの分解条件

ノニルフェノール濃度: 0.5mg/ml

浴比: 0.5cm HF/ml

30℃、1時間反応

今回の実験では、反応生成物の同定は行っていないが、ビスフェノール A 及びノニルフェノールは図 11 に示すように変換する事が報告されている^{17, 18)}。

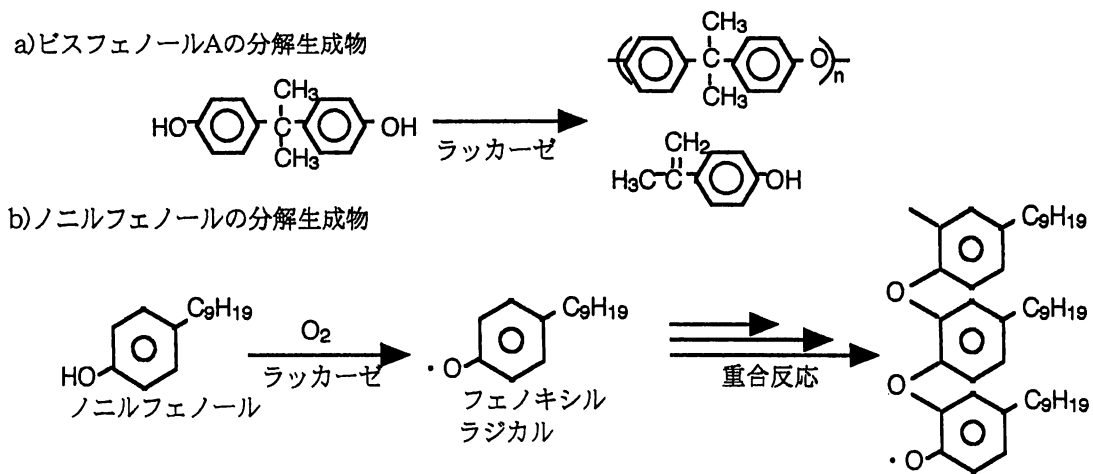


図 11. ラッカーゼによるビスフェノールA(a)及びノニルフェノールの分解生成物(b).

11. 有機溶媒-水混合系での固定化酵素活性

種々の混合比のアセトニトリル(AN)-水系での MAMEC 処理及び縮合型(Bis)の固定化酵素についてカテコール及びBPAの分解活性を図12、図13、図14に示す。

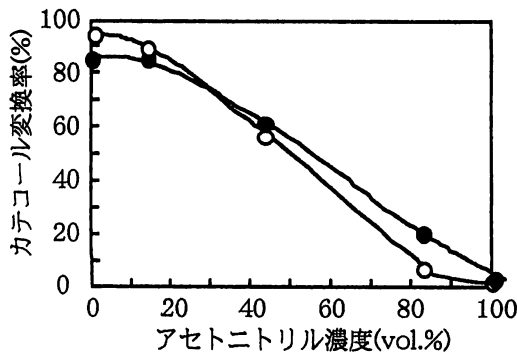


図 12. アセトニトリル/酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)中での固定化酵素のカテコール分解活性.

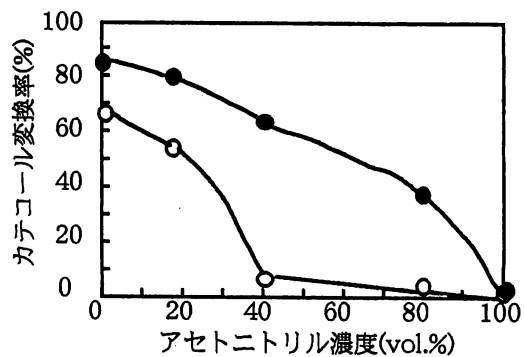


図 13. アセトニトリル/酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)中での固定化酵素のカテコール分解活性.

AN-酢酸ナトリウム緩衝液系及び AN-純水系では AN の比率が増大するにつれてカテコールの分解活性は低下し、100%AN ではいずれの固定化酵素とも消失した。又、図 14 から明らかなように BPA の分解活性についても AN-酢酸ナトリウム緩衝液中で AN の含有量が 30vol%以下の範囲では AN 含有量の増加に伴って BPA の分解率は低下したが、MAMEC 処理酵素は縮合型と比べるとより高い活性を維持している事が判明した。

次に、AN 中での酵素固定化膜の保存安定性をカテコール分解活性から調べた。純 AN 中で 3 日間保存したところ、いずれの固定化法の膜も固定化量の低下はないが、酢酸ナトリウム緩衝液中でのカテ

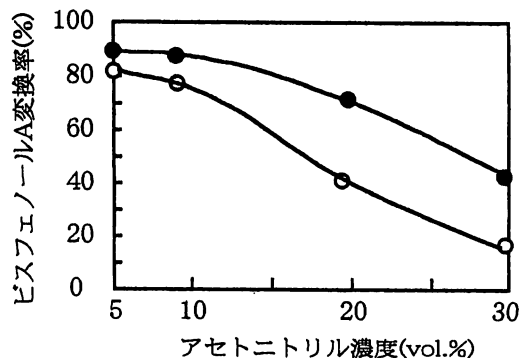


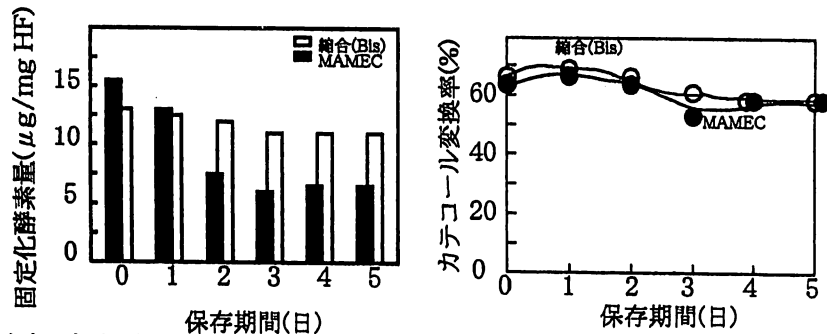
図 14. アセトニトリル/酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)中での固定化酵素のビスフェノールA分解活性.

コール分解活性は図 15 から明らかな様に、MAMEC 処理固定化酵素では活性を維持していたが、縮合型酵素では活性は著しく低下した。

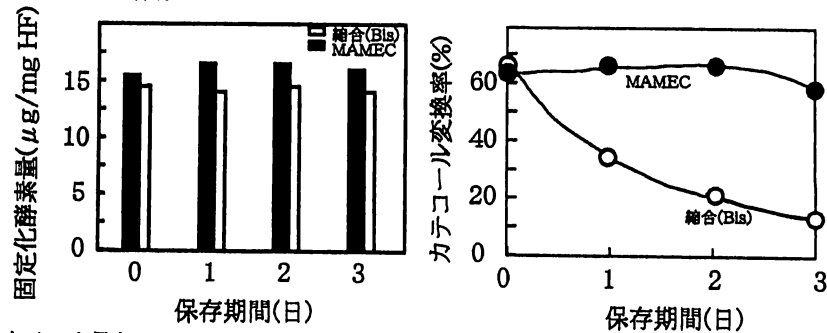
また、純エタノール中に保存した場合も、同様に固定化酵素量の低下はみられなかったが、AN の場合と比べるとカテコール分解活性は両者とも顕著に低下した。しかし、MAMEC 処理酵素の低下率が少ない事は注目される。

以上、有機溶媒-水混合系でのカテコール及 BPA の分解活性について MAMEC 処理固定化酵素の活性低下率が縮合型に比べて少ない事は興味深い。この現象はおそらく MAMEC 鎖の両親媒性効果に基づくためと考えられる。

(A)リン酸ナトリウム緩衝液保存



(B)純アセトニトリル保存



(C)純エタノール保存

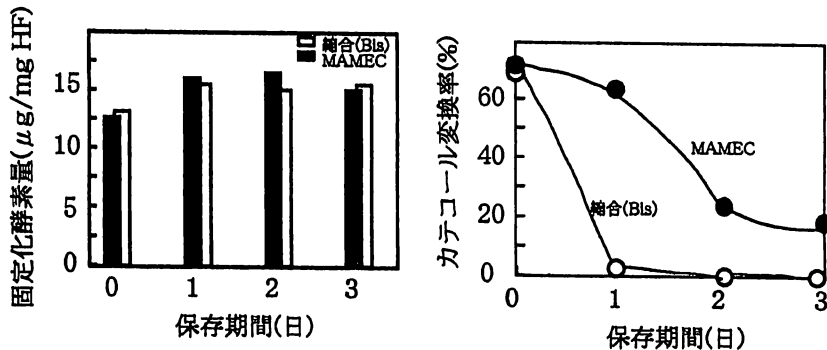


図 15. 酵素固定化中空糸膜の各種の溶媒における保存安定性.

- 酵素固定化中空糸膜をリン酸ナトリウム緩衝液中に保存した場合の酵素活性変化
- 酵素固定化中空糸膜を純アセトニトリル中に保存した場合の酵素活性変化
- 酵素固定化中空糸膜を純エタノール中に保存した場合の酵素活性変化

まとめ

ラッカーゼを縮合、MAMEC、GA、エポキシ法で共有結合により PVA 中空糸膜に固定化した。いずれの膜においても酵素の固定化が確認できた。また、それらの酵素固定化中空糸膜の活性、pH 依存性、熱安定性、繰り返し使用及び保存安定性を調べた。4 種の固定化酵素は若干活性は低下するものの Free 酵素と同様の性質を示した。また、繰り返し使用について検討したところ、10 回の使用後にも固定化酵素の活性が確認できた。環境ホルモンの疑いのあるビスフェノール A およびノニルフェノールに対しても有効な活性がみられた。また、有機溶媒の共存下において固定化酵素の活性を調べた結果、両親媒性を有する MAMEC 処理酵素では有効な活性がみられた。

参考文献

- 1) L. Gianfreda, F. Xu and JM. Bollag, *Bioremediation Journal*, **3** (1), 1-25 (1999)
- 2) T. Tanaka, K. Yamada, T. Tonosaki, T. Konishi, H. Goto and M. Taniguchi, *Water Sci. Technol.*, **42**, Nos. 7-8, 89-95 (1995)
- 3) S.Wada, H.Ichikawa and K.Tatsumi, *Biotechnol.Bioeng.*, **42**, 854-858 (1993)
- 4) A. Sakurai, S. Toyoda and M.Sakakibara, *Biotechnology Letters*, **23**, 995-998 (2001)
- 5) AM. Klibanov, T. Tu and KP. Scott, *Science*, **221**, 259-261 (1983)
- 6) MF. Chaplin and C. Bucke, *Enzyme Technology*, Cambridge University Press, New York, 1990
- 7) 小松賢作, *工業材料*, **44**(6), 46-49 (1996)
- 8) 株式会社 高研、*酵素資料*
- 9) K. Takakura, S. Satoh and K.Inai, *Advances in Polymeric Biomaterials Science*, 1997, Akaike et al, (eds.) Tokyo, CMC, 193-202.
- 10) GT. Hermanson, AK. Malla and PK. Smith, *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press, San Diego, 1992, pp. 118-119.
- 11) SL. Snyder and PZ.Sobocinski, *Anal. Biochem.*, **64**, 284-288 (1975)
- 12) 分析化学便覧、日本分析化学会、丸善、1971、p. 495.
- 13) 武田薬品工業株式会社、ビスフェノール A(BPA)ELISA キット使用説明書[環境庁水質保全水質管理課：外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(水質、底質、水生生物)]
- 14) 武田薬品工業株式会社、アルキルフェノール(AP)ELISA キット使用説明書[環境庁水質保全水質管理課：外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(水質、底質、水生生物)]
- 15) S.Emi, Y.Murase and T.Hayashi, *J. Appl. Polym. Sci.*, **41**, 2753-2767 (1990)
- 16) K. Itoyama, Y. Murase and T. Hayashi, *Biotechnol. Progr.*, **10**(2), 225-229 (1994)
- 17) T. Fukuda, H. Uchida, Y. Takashima, T. Kawabata and M. Suzuki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 704-706 (2001)
- 18) T. Tanaka, [hppt://kino.eng.nigata-u.ac.jp/tctanaka/tctanaka.html](http://kino.eng.nigata-u.ac.jp/tctanaka/tctanaka.html)

Covalent Immobilization of Laccase onto Microporous Polyvinyl Alcohol Hollow-Fiber Membrane Supports and their Application to Removal of Phenolic Compounds from Aqueous Mixtures

Kiyomitsu IKEI, Ayano SUZUKI*, Daisuke NAKATSUKA* and Koichi TAKAKURA**

Graduate School of Science

**Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering,*

***Research Institute of Technology*

Okayama University of Science

1 - 1, Ridai-cho, Okayama 700-0005, Japan

(Received September 30, 2004; accepted November 5, 2004)

Covalent immobilization of laccase from *Pycnoporus coccineus* onto microporous polyvinyl alcohol (PVA) hollow-fiber membrane has been accomplished in the following manner. PVA membrane was reacted with polyallylamine or ethylenediamine by reductive amination in an aqueous solution, followed by coupling of enzyme to an aminated membrane according to four different immobilization methods, i.e. condensation, and activation with use of maleic anhydride-methylvinyl ether copolymer (MAMEC), glutaraldehyde and chloromethyloxirane (epoxy), respectively. The ability of the immobilized laccase to degrade (oxidize) phenolic substrates including catechol, and endocrine-disrupting chemicals such as bisphenol A and nonylphenol has been examined. The enzyme-immobilized membranes exhibited the desirable activity, as revealed by removal efficiency of catechol, showing similar pH-dependence and thermal stability as those of free enzyme. Bisphenol A and nonylphenol were degraded significantly as well. The activity of the immobilized enzyme was found dependent upon a type of the immobilization method and kinds of buffers used. Among the four immobilization methods, the immobilized enzymes prepared by condensation and MAMEC activation method seem promising. In particular, MAMEC-activated enzyme maintained relatively high activity even in the mixture of acetonitrile-water, presumably due to the amphiphilic property of MAMEC used as a linker. The enzyme-immobilized membranes could retain their activity to an appreciable extent after several repeated incubations, although they were increasingly discolored, probably due to the resulting polymeric deposits. Based on the results obtained, it is expected that these laccase-immobilized PVA membranes would be applicable for decontamination of phenolic-polluted systems.