

固定化海洋性微細藻類による配糖化を利用したバイオレメディエーションに関する研究

下田 恵¹, 浜田 博喜², 内村 祐之³

¹大分大学医学部, ²岡山理科大学理学部, ³愛媛県水産試験所

概要 環境ホルモン、農薬成分、ダイオキシン類は、水や大気を介して拡散し、河川を通して最終的に海洋に流入し、地球環境を長期にわたって汚染する。環境汚染物質の中で、特に、ビフェニル化合物は、プラスチックやコーティング剤、農薬など多岐にわたり使用されており、年間、大量に消費されている。このため、自然界に放出されるビフェニル化合物の浄化の対策を早急に講じる必要がある。

本研究では、海洋に流入したベンゾフェノン、海洋性微細藻類による配糖化を利用して無毒化する、独創的なバイオレメディエーションを開発することを研究目的としている。瀬戸内海に生息する海洋性微細藻類を中心にスクリーニングを行った結果、*Amphidinium crassum* にベンゾフェノンの配糖化活性を見出した。さらに、固定化海洋性微細藻類を利用した汚染海水の浄化システムを構築することを目的として、包摂固定化法により *A. crassum* を固定化し、そのベンゾフェノンの配糖化機能について調べた。固定化ゲル濃度については、2%のアルギン酸ナトリウムゲルが、ベンゾフェノンの配糖化の至適濃度であることが明らかとなった。この濃度条件で固定化した *A. crassum* は、固定化していないものと比較して、最大で 1.2 倍の高い配糖化活性を持つことが明らかとなった。

これまでにフェノール類のバイオレメディエーション研究は、微生物を使用した研究が主になされており、この微生物変換によるバイオレメディエーションには、分解されにくいフェノール類を浄化できない問題点があった。固定化海洋性微細藻類による配糖化は、毒性の高いフェノール性水酸基の無毒化に有効な化学修飾であり、ビフェニル化合物に汚染された海水の浄化に有効な手立てとなることが示唆された。

1. 研究目的

樹脂で構成される工業製品の原料となるビスフェノール A やベンゾフェノン、農薬の成分であるフッ素化フェノール類、また、ごみを燃焼する際に生じるダイオキシン類は、水や大気を介して拡散し、河川を通して最終的に海洋に流入し、地球環境を長期にわたって汚染する。

これらの環境汚染物質のうち、ビスフェノール A やベンゾフェノンなどのビフェニル化合物は、ポリカーボネート製プラスチックの原料として年間、大量に使用され、また、ポリカーボネートの用途はサングラスや CD から水・食品の容器まで多くの日用品にわたり年間大量に消費されている。このことから、近年、製造工程により環境中に放出されるビフェニル化合物による人体・環境への影響が懸念され

ている。

ビフェニル化合物は、エストロゲンに類似した生理活性を示すことが報告されており、米国国立環境衛生科学研究所などにより、内分泌かく乱化学物質として指定されている化合物である。ベンゼン環を分子内に持つ環境汚染物質のバイオレメディエーションは、土壌細菌が持つ、ベンゼン環の分解による浄化機能の研究が一般的である^[1-3]。しかし、ベンゼン環の配糖化による無毒化に関する研究は殆ど行われていない。配糖化は、毒性の高いフェノール性水酸基の無毒化に有効な化学修飾であり^[4-14]、ビフェニル化合物の浄化に有効な手立てとなると期待される。

本研究では、海洋に流入した環境汚染物質を、海洋性

微細藻類による配糖化を利用して無毒化する、独創的なバイオレメディエーションの開発を目指し、環境汚染物質を配糖化する能力のある海洋性微細藻類の発見と、その能力を最大限に活用するため、固定化海洋性微細藻類を利用した汚染海水の浄化システムの構築を行うことを研究目的としている。申請者らは、上記目的の達成のため、フッ素化フェノール類、ビスフェノール A、ベンゾフェノン、ダイオキシン類を配糖化する活性を有する海洋性微細藻類のスクリーニングと、固定化海洋性微細藻類によるこれら環境汚染物質の配糖化能力の解明を行っている。平成 24 年度は、ピフェニル化合物のうち、ベンゾフェノンについて主に、バイオレメディエーション研究を行った。その際、ベンゾフェノンは水酸基を持たないため、ケトン基を生物変換により還元して水酸基を生じた後に、配糖化する必要がある、還元能力と配糖化能力の高い海洋性微細藻類のスクリーニングが必要となる。本研究では更に、固定化海洋性微細藻類によるベンゾフェノンの配糖化機能についても明らかにした。

2. 研究方法

2. 1 海洋性微細藻類の培養

本研究で使用した海洋性微細藻類は、一般的に沿岸部に見られる微細藻類のうち、岡山理科大学および愛媛県水産試験所が所有する瀬戸内海に生息する海洋性微細藻類の株を中心に用いて行った。

海洋性微細藻類の培養は、市販の藻類培養液(KW21 太平洋貿易株式会社)を使用して行った。培養は、25°C、光照射条件下、オープンエア/エアレーション条件、振盪条件下において行った。

2. 2 海洋性微細藻類によるバイオトランスフォーメーション

海洋性微細藻類による環境汚染物質の物質変換(バイオトランスフォーメーション)実験は、藻類を 800 rpm で 15 分間の遠心による濃縮の後、Table 1 に示す組成の人工海水を利用して行った。

バイオトランスフォーメーションによる反応は、300 ml の人工海水と 9 g の海洋性微細藻類を含む、500 ml 培養用フラスコに、基質となる 0.2 mmol の環境汚染物質(ベンゾフェノン)を投与することにより行った。環境汚染物質を投与された海洋性微細藻類は、オープンエア/エアレーシ

Table 1. The constituents of synthetic seawater

Constituents ^a	Conc. (g/l)	Constituents ^a	Conc. (g/l)
NaCl	20.7	AlCl ₃ ·6H ₂ O	8x10 ⁻⁶
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1x10 ⁻⁶	FeCl ₃ ·6H ₂ O	5x10 ⁻⁶
MgCl ₂ ·6H ₂ O	9.5	Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	2x10 ⁻⁷
CaCl ₂ ·6H ₂ O	1.3	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	2x10 ⁻⁵
Na ₂ SO ₄	3.5	Na ₂ SiO ₃	5x10 ⁻²
KCl	0.6	NaNO ₃	0.2
NaHCO ₃	0.2	Na ₂ HO ₄	1x10 ⁻²
KBr	9x10 ⁻²	EDTA-2Na	9x10 ⁻⁴
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	3x10 ⁻²	Vitamin B ₁₂	2x10 ⁻⁶
SrCl ₂	1x10 ⁻²	Thiamine·HCl	8x10 ⁻⁵
NaF	3x10 ⁻³	Biotin	1x10 ⁻⁶
LiCl	1x10 ⁻³	EDTA-Fe	3x10 ⁻³
KI	7x10 ⁻⁵	H ₂ NC(CH ₃ OH) ₃	5x10 ⁻³
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2x10 ⁻⁷		

^a Constituents are dissolved in distilled water.

yon条件、振盪器を利用した回転振盪条件下(100 rpm)で、8日間反応を行った。バイオトランスフォーメーション生成物は、以下の手順で抽出と分析を行った。1,000 rpmで30分間、遠心処理することにより海洋性微細藻類と人工海水に分離した。海洋性微細藻類はメタノールにより浸漬処理し、24時間後に5分間の超音波処理を行った。メタノール画分は、減圧下において濃縮を行った後、蒸留水と酢酸エチルを用いて分画を行った。水画分は、ブタノールによる抽出を行った。人工海水は、酢酸エチルによる抽出を行った後、ブタノールにより抽出を行った。酢酸エチル画分は、先の酢酸エチル画分と合わせた後、減圧下で濃縮し、高速液体クロマトグラフィーで分析を行った。ブタノール画分についても、2画分を合わせた後、減圧下で濃縮し、高速液体クロマトグラフィーによる分析を行った。

ブタノール画分に含まれるバイオトランスフォーメーション生成物は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取TLCの後、高速液体クロマトグラフィーにより、順次精製を行った。高速液体クロマトグラフィーの精製条件は以下の通りである。使用カラム:YMC-Pack R&D ODS column (150 x 30 mm); 溶媒:CH₃CN-H₂O(3:17, v/v); 分析:UV(280 nm); 流速:1.0 ml/min。

バイオトランスフォーメーション生成物の構造解析は、JEOL MStation JMS-700 spectrometerを使用したFABMS分析、および、Varian XL-400 spectrometerを使用した¹H and ¹³C NMR, H-H COSY, C-H COSY, and HMBC スペクトル分析により行った。

2.3 固定化海洋性微細藻類によるバイオトランスフォーメーション

海洋性微細藻類のアルギン酸ナトリウムゲルによる包摂固定化は以下の手順で行った。アルギン酸ナトリウムゲルの最適濃度を調べるため、1~5%のアルギン酸ナトリウムを50 mlの水に加え、120°Cで30分間オートクレーブにかけた。溶解、冷却の後、海洋性微細藻類を9 g加え、混合液を室温で2時間、液が均一になるまで穏やかに攪拌した。5%の塩酸カルシウム溶液に、混合液を注射器を使用して一定速度で滴下することにより、平均粒径5 mmの固定化海洋性微細藻類を調製した。

固定化海洋性微細藻類を使用したバッチ法によるバイオトランスフォーメーションは、以下のように行った。上記で調製した固定化海洋性微細藻類と250 mlの人工海水

を含む500 ml培養用フラスコに、0.2 mmolの環境汚染物質(ベンゾフェノン)を投与した。環境汚染物質を投与された固定化海洋性微細藻類は、オープンエア条件、振盪器を利用した回転振盪条件下(100 rpm)で、5日間反応を行った。固定化海洋性微細藻類を使用して得られたバイオトランスフォーメーション生成物は、上記の2.2と同様の手順で分析と精製を行った。一方、バイオトランスフォーメーション生成物の抽出は人工海水部分から行った。

2.4 海洋性微細藻類および固定化海洋性微細藻類による経時変化

海洋性微細藻類による、環境汚染物質のバイオトランスフォーメーション反応の経時変化は、以下の手順で行った。2.2と同様に、0.2 mmolのベンゾフェノンを投与した300 mlの人工海水と9 gの海洋性微細藻類を含む、500 ml培養用フラスコを8本用意し、それぞれのフラスコに0.2 mmolの環境汚染物質を投与した。ベンゾフェノンを投与された海洋性微細藻類は、オープンエア条件、振盪器を利用した回転振盪条件下(100 rpm)で反応を行い、1日ごとに1本のフラスコの反応を停止してバイオトランスフォーメーション生成物の高速液体クロマトグラフィーによる分析を行った。固定化海洋性微細藻類を使用した場合のバイオトランスフォーメーション生成物の分析も同様に、人工海水部分に含まれる物質の高速液体クロマトグラフィーによる分析を行った。

3. 研究結果

3.1 海洋性微細藻類のスクリーニング

環境汚染物質であるベンゾフェノン(化合物番号1)を投与した海洋性微細藻類の内、*Amphidinium crassum*のみが配糖化活性を示し(Table 2)、バイオトランスフォーメーション生成物として化合物2および3を与えた。

化合物3のFABMS分析の結果、[M+Na]⁺のm/zピークが369に見られ、化合物3はジフェニルメタノール1分子とヘキソース1分子からなる化合物と考えられた。化合物3の¹H NMRスペクトルの4.45 ppmにおけるJ=7.6 Hzのアノマープロトンのシグナル、および、3.66~4.15 ppmにおける特徴的なシグナル、¹³C NMRスペクトルにおける62.6~101.1 ppmの特徴的なシグナルから、化合物3はジフェニルメタノール(2)のβ-グルコシド体であることがわかった。HMBCスペクトルにおいて、4.45 ppmにおけるアノ

マープロトンのシグナルと1位の81.1 ppmの¹³C NMRシグナルに相関が見られたことから、β-グルコシドが結合した位置はジフェニルメタノール(化合物番号2)の1位であることが明らかとなった。

海洋性微細藻類 *A. crassum* によるベンゾフェノン(1)の配糖化によるバイオレメディエーションのスキームを Fig. 1 に示す。

3. 2 固定化海洋性微細藻類によるバイオレメディエーション

海洋性微細藻類 *A. crassum* によるベンゾフェノン(1)の配糖化の効率を高めるため、アルギン酸ナトリウムによる

A. crassum の包摂固定化を行った。最も有効なアルギン酸ナトリウム濃度を決定するため、1~5%のアルギン酸ナトリウムゲルによる固定化海洋性微細藻類 *A. crassum* を調製した。各濃度のアルギン酸ナトリウムゲルで固定化した海洋性微細藻類による、ベンゾフェノン(1)のバイオトランスフォメーションを行い、生成物のジフェニルメチルβ-グルコシドの生成量を比較した。その結果、Fig. 2に見られるように、2%のアルギン酸ナトリウムゲルにより固定化された海洋性微細藻類 *A. crassum* が最も高いベンゾフェノン(1)の配糖化活性を示した。このため、以後の固定化海洋性微細藻類 *A. crassum* によるバイオトランスフォメーション実

Table 2. The bioremediation of benzophenone (1) by marine microalga

Marine microalga	Conc. of 2 (μg/g cells)	Conc. of 3 (μg/g cells)
<i>Amphidinium crassum</i>	22	14
<i>Chrysocampanulla spinifera</i>	70	—
<i>Chaetoceros gracilis</i>	55	—
<i>Chaetoceros danicus</i>	51	—
<i>Cochlodunium catenatum</i>	45	—

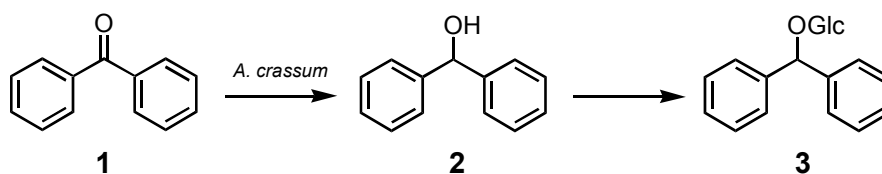


Fig. 1. Bioremediation of benzophenone (1) to diphenylmethyl β-D-glucoside (3) via diphenylmethanol (2) by cultured cells of *A. crissum*

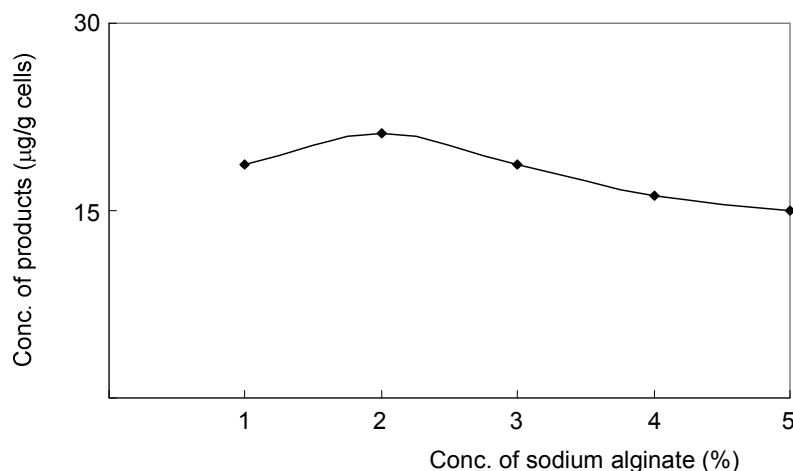


Fig. 2. Effects of sodium alginate concentration on the glucosylation activity of the immobilized cells of *A. crassum* against bisphenol A (1). Concentration (μg/g cells) of bisphenol A β-D-glucoside (2) (◆) is plotted.

験は、2%のアルギン酸ナトリウムゲルで包摂したものを使用した。

固定化された海洋性微細藻類 *A. crassum* によるベンゾフェノン(1)の配糖化能力を検証するため、海洋性微細藻類 *A. crassum* と、固定化された *A. crassum* によるベンゾフェノン(1)のバイオトランスフォーメーションの経時変化を比較した。Fig. 3 に示したように、海洋性微細藻類 *A. crassum* によりベンゾフェノン(1)は時間経過と共に配糖化が進行し、8 日後にはジフェニルメチル β-グルコシドは最大値まで濃度が上昇することがわかった。

これに対し、固定化海洋性微細藻類 *A. crassum* によるベンゾフェノン(1)の配糖化は、固定化していないものと比較して、効率的に進行し、ジフェニルメチル β-グルコシドの蓄積が高まることが明らかとなった。

比較のため、海洋性微細藻類 *A. crassum* および固定化した *A. crassum* による、ベンゾフェノン(1)のバイオトランスフォーメーションの反応開始後 5 日目のジフェニルメチル β-グルコシド濃度を、Table 3 に示す。ここに示したように、ベンゾフェノン(1)のバイオトランスフォーメーションにおいて、

固定化海洋性微細藻類 *A. crassum* の方が、高い配糖化活性を持つことが明らかとなった。

次に、ベンゾフェノン(1)の還元活性が高かった *Chrysocampanulla spinifera* を 2%のアルギン酸ナトリウムゲルで包摂して固体化海洋性微細藻類を調製した。この固定化海洋性微細藻類 *C. spinifera* と固定化海洋性微細藻類 *A. crassum* を順次触媒として使用して、ベンゾフェノン(1)からジフェニルメチル β-グルコシド(3)の生産効率を調べた。結果を Table 4 に示す。固定化海洋性微細藻類 *A. crassum* のみでベンゾフェノン(1)を変換した場合と比較して、固定化海洋性微細藻類 *C. spinifera* と固定化海洋性微細藻類 *A. crassum* を順次使用した場合、高い変換率でジフェニルメチル β-グルコシド(3)が生成することが分かった。このことから、ベンゾフェノンの還元能力が高い固定化海洋性微細藻類 *C. spinifera* を使用してジフェニルメタノールに変換した後に、固定化海洋性微細藻類 *A. crassum* を使用してジフェニルメチル β-グルコシドへ配糖化したほうがより効率的にベンゾフェノンを除去できることが明らかとなった。

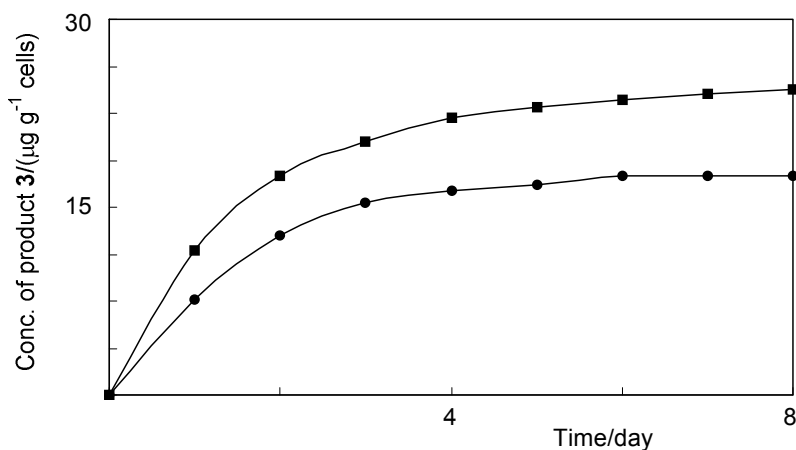


Fig. 3. Time course of the glycosylation of benzophenone (1) by cultured *A. crassum* and immobilized *A. crassum*. Yields of the product 3 by biotransformation with cultured (●) and immobilized (■) *A. crassum* are plotted.

Table 3. Glycosylation of bisphenol A by cultured and immobilized *A. crassum*

Substrate	Conc. of product (µg/g cells)	
	Cultured <i>A. crassum</i>	Immobilized <i>A. crassum</i>
1	15	20

Table 4. The bioremediation of benzophenone (**1**) by immobilized marine microalga

Immobilized marine microalga	Conc. of product 3 ($\mu\text{g/g}$ cells)
<i>A. crassum</i>	20
<i>C. spinifera</i> \rightarrow <i>A. crassum</i>	28
<i>C. gracilis</i> \rightarrow <i>A. crassum</i>	22

4. 考 察

プラスチックなどの工業原料であり、内分泌かく乱化学物質とされるビフェニル化合物の配糖化を利用したバイオレメディエーションを目的として、配糖化活性を有する海洋性微細藻類のスクリーニングを行った。その結果、今回スクリーニングした株のうち、*A. crassum* に、ベンゾフェノンの高い配糖化活性が見られた。

海洋性微細藻類の配糖化機能を最大限に活用し、固定化海洋性微細藻類を利用した汚染海水の浄化システムの構築を行うことを目的として、固定化 *A. crassum* のベンゾフェノン配糖化活性を調べた。その結果、固定化していないものと比較すると、今回基質としたベンゾフェノンに対し、固定化 *A. crassum* が、効率的に、ジフェニルメチル β -グルコシドへ変換することが明らかとなった。

近年、環境ホルモンであるビスフェノール A が、配糖化により、その内分泌攪乱作用が著しく低下することが報告されている^[15]。今回、海洋に流入した環境汚染物質であり、微生物分解されにくいベンゾフェノンの浄化に、海洋性微細藻類による配糖化が有効な手立てとなることが示唆された。また、固定化海洋性微細藻類は、ベンゾフェノンに汚染された海水を浄化するバイオリクターとして有効であると期待される。

5. 今後の課題

今回、海洋に流入する環境汚染物質のうち、フェノール性水酸基を有する化合物のバイオレメディエーションには、固定化 *A. crassum* による配糖化を利用した浄化システムが有効であることが示唆された。

今後、フェノール性水酸基を有する環境ホルモンのみならず、水酸基を持たない物質のバイオレメディエーションにも、固定化 *A. crassum* が有効であることの検証と、更なるスクリーニングにより、環境汚染物質を配糖化する能

力のある海洋性微細藻類の探査を引き続き行う。特に、分子内に水酸基を持たないダイオキシン類について、分子内ベンゼン環の水酸化の後、配糖化する海洋性微細藻類のスクリーニングと、その固定化海洋性微細藻類を利用した浄化システムの構築を行う。これらの研究により、海洋に流入する種々の環境汚染物質について、配糖化による浄化作用の検討を系統的に行う。

謝 辞

本研究を進めるにあたり御助成を賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) T. Iwasaki, K. Miyauchi, E. Masai, M. Fukuda, Multiple-subunit genes of the aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase play an active role in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5396-5402 (2006).
- 2) L. Y. Jia, A. P. Zheng, L. Xu, X. D. Huang, Q. Zhang, F. L. Yang, Isolation and characterization of comprehensive polychlorinated biphenyl degrading bacterium, *Enterobacter* sp. LY402. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 952-957 (2008).
- 3) T. Artham, M. Doble, Biodegradation of aliphatic and aromatic polycarbonates. *Macromol. Biosci.* 8, 14-24 (2008).
- 4) T. Furuya, M. Ushiyama, Y. Ashida, T. Yoshikawa, Biotransformation of 2-phenylpropionic acid in root culture of *Panax ginseng*. *Phytochemistry* 28, 483-487 (1989).

- 5) S. Kamel, M. Brazier, G. Desmet, M.-A. Fliniaux, A. Jacquin-Dubreuil, Glucosylation of butyric acid by cell suspension culture of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Phytochemistry* 31, 1581-1583 (1992).
- 6) E. Lewinson, E. Berman, Y. Mazur, J. Gressel, Glucosylation of exogenous flavanones by grapefruit (*Citrus paradisi*) cell cultures. *Phytochemistry* 25, 2531-2535 (1996).
- 7) K. Shimoda, Y. Kondo, K. Abe, H. Hamada, H. Hamada, Formation of water-soluble vitamin derivatives from lipophilic vitamins by cultured plant cells. *Tetrahedron Lett.* 47, 2695-2698 (2006).
- 8) K. Shimoda, Y. Kondo, T. Nishida, H. Hamada, N. Nakajima, H. Hamada, Biotransformation of thymol, carvacrol, and eugenol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry* 67, 2256-2261 (2006).
- 9) Y. Kondo, K. Shimoda, N. Kubota, H. Hamada, H. Hamada, Biotransformation of monofluorophenols by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. *Plant Biotechnol.* 23, 329-331 (2006).
- 10) K. Shimoda, T. Harada, H. Hamada, N. Nakajima, H. Hamada, Biotransformation of raspberry ketone and zingerone by cultured cells of *Phytolacca americana*. *Phytochemistry* 68, 487-492 (2007).
- 11) K. Shimoda, Y. Kondo, M. Akagi, K. Abe, H. Hamada, H. Hamada, Glycosylation of tocopherols by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry* 68, 2678-2683 (2007).
- 12) K. Shimoda, H. Hamada, H. Hamada, Glycosylation of hesperetin by plant cell cultures. *Phytochemistry* 69, 1135-1140 (2008).
- 13) K. Shimoda, H. Hamada, H. Hamada, Phytoremediation of benzophenone and bisphenol A by glycosylation with immobilized plant cells. *Environ. Health Ins.* 3, 19-25 (2009).
- 14) K. Shimoda, R. Yamamoto, H. Hamada, Bioremediation of bisphenol A by glycosylation with immobilized marine microalga *Amphidinium crassum*. *Adv. Chem. Eng. Sci.* 1, 90-95 (2011).
- 15) K. Morohoshi, F. Shiraishi, Y. Oshima, T. Koda, N. Nakajima, J. S. Edmonds, M. Morita, Synthesis and estrogenic activity of bisphenol A mono- and di-beta-D-glucopyranosides, plant metabolites of bisphenol A. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2275-2279 (2003).

Bioremediation of Environmental Pollutions by Glycosylation with Immobilized Marine Microalga

Kei Shimoda ¹, Hiroki Hamada ², Yushi Uchimura ³

¹ Faculty of Medicine, Oita University; ² Faculty of Science, Okayama University of Science;

³ Ehime Prefectural Fisheries Experimental Station

Summary

Biphenyl compounds such as bisphenol A and benzophenone have been listed among “chemicals suspected of having endocrine disrupting effects” by the World Wildlife Fund, the National Institute of Environmental Health Sciences in the USA and the Japanese Environment Agency. The biphenyl compounds exhibited estrogenic activity in bioassays. These compounds are widely used to manufacture polyacrylates, ether resins, phenol resins, insecticides, agricultural chemicals, pharmaceuticals, and coatings, and their residues are released as pollutants into rivers and seas. In the case of bisphenol A, worldwide production capacity was estimated about 1,100 million pounds. From the viewpoint of seawater pollution control, metabolism of biphenyl compounds by marine microalgae is of importance.

This study focused on the metabolism of biphenyl compounds by cultured and immobilized marine microalga. Biotransformation product was isolated from the cultured cells of *A. crassum*, which had been treated with benzophenone. Potentially glucosylated product was obtained, and its chemical structure was determined on the basis of their FABMS, ¹H and ¹³C NMR, H-H COSY, C-H COSY, and HMBC spectra as diphenylmethyl β-D-glucoside. The glucosylation activity of immobilized *A. crassum* cells was enhanced at 2% sodium alginate concentration. Use of immobilized *A. crassum* cells improved the glycosylation activity, and the amount of glycosides was much enhanced in comparison with the case of biotransformation with cultured *A. crassum* cells.

From the viewpoint of seawater pollution control, glycosylation of biphenyl compounds by immobilized marine microalga is important and environmentally friendly.