

## 9331 塩刺激に応答する可溶不溶可逆機能性生体触媒の開発とその応用

助成研究者:谷口 正之(新潟大学 工学部)

共同研究者:星野 一宏(富山大学)

## 1. 研究目的

塩および温度応答性のNIPAM-GMA共重合体を生体触媒固定化用担体として開発したが、pH応答性高分子に比べて、1) 刺激に対する応答速度、2) 共重合体当たりの酵素蛋白質の結合量、3) 繰り返し反応後の回収率などの面で劣っており、さらに高性能な刺激応答性高分子を調製する必要がある。

そこで、本研究では塩や温度の刺激に対して可逆的に応答する新規な機能性高分子に酵素蛋白質を固定化し、両者の特性を備えた刺激応答性の固定化酵素を開発し、その性質について検討した。また、刺激に可逆的に応答する可溶・不溶酵素を、バイオマスの有用物質への変換反応に応用することについて検討した。

## 2. 研究方法

刺激応答性高分子の調製 刺激応答性高分子はN-isopropyl acrylamide(NIPAM)とmethacrylic acid(MAA)を重合することによって調製した。

刺激応答性生体触媒の調製 バイオマスの有用物質への変換反応に応用することを目的として、本研究では生体触媒としてグルコアミラーゼ製剤であるダビアーゼ(ダイキン工業(株))を選択した。ダビアーゼのNIPAM-MAAへの固定化は、水溶性カルボジイミドを用いる共有結合法によって行った。

食塩の濃度変化を利用した繰り返し反応 食塩濃度の変化を利用して固定化ダビアーゼを繰り返し用いながら可溶性デンプンおよび生デンプンを加水分解した。

## 3. 研究結果および考察

MAAとNIPAMを共重合することにより、食塩濃度の変化あるいは温度変化によって可逆的に相変化する高分子を調製できた。この高分子に生デンプン分解酵素ダビアーゼを固定化した結果、食塩濃度の変化によって溶解性を可逆的に調節できる可溶・不溶可逆アミラーゼを調製できた。この新規な固定化アミラーゼは、可溶状態で可溶性デンプンおよび生デンプンに効率よく作用し、かつ食塩濃度あるいは温度を上げることによって不溶化でき、糖液と分離できた。したがって、固定化アミラーゼは可溶状態で効率よく可溶性デンプンに作用した後に食塩濃度を上げることによって回収でき、可溶性デンプンおよび生デンプンの加水分解に繰り返し利用できた。また、この固定化アミラーゼは同一の食塩濃度において温度を上げることによって不溶化し回収でき、両デンプンの加水分解に繰り返し利用できた。

以上の結果より、新規に調製したNIPAM-MAA共重合体は、NIPAM-GMA共重合体に比べて、1) 刺激に対する応答速度、2) 共重合体当たりの酵素蛋白質の結合量、3) 操作安定性などの面で優れていることが明らかとなった。また、NIPAM-MAAに固定化した酵素の活性は、可溶性デンプンばかりでなく生デンプンを基質としたときにも高いことがわかった。



## 9331 塩刺激に応答する可溶不溶可逆機能性生体触媒の開発とその応用

助成研究者: 谷口 正之(新潟大学 工学部)

共同研究者: 星野 一宏(富山大学)

## 1. 研究目的

可溶・不溶可逆生体触媒を、pHおよび温度応答性高分子に数種類の酵素蛋白質を固定化して調製し、それらを既にいくつかの反応に利用してきた。<sup>1-5)</sup>しかし、開発した可溶・不溶可逆固定化酵素は可溶状態で固体基質に効率よく作用した後、不溶化することによって回収再利用できるが、pHまたは温度の繰り返し上下による失活、循環利用における塩の蓄積による見かけの活性低下などpHまたは温度変化に伴う不可避な問題があった。また、前報において調製した塩および温度応答性可溶・不溶可逆担体であるNIPAM-GMA共重合体は、pH応答性高分子に比べて、1) 刺激に対する応答速度、2) 共重合体当たりの酵素蛋白質の結合量、3) 繰り返し反応後の回収率などの面で劣っており、<sup>6)</sup>さらに、高性能な刺激応答性高分子を調製する必要があると考えられる。

そこで、本研究では第一に塩や温度の刺激に対して可逆的に応答する機能性高分子を調製し、その性質について明らかにすることを目的とする。次に、調製した刺激応答性高分子に酵素蛋白質を固定化し、両者の特性を備えた新規な固定化酵素を開発し、その性能について検討した。また、刺激に可逆的に応答する可溶・不溶酵素をバイオマスの有用物質への変換反応に応用することについて検討した。

## 2. 研究方法

## 2. 1 刺激応答性高分子の調製

N-isopropyl acrylamide(NIPAM)と組み合わせるモノマーを検索した結果、methacrylic acid(MAA)を選択した。刺激応答性高分子は次のようにして調製した。ヘキサンにより重合禁止剤を除いた後、NIPAM単独およびNIPAMとMAAを組み合わせセパラブルフラスコにいれ、所定の温度(通常は65℃)に設定するとともに、窒素ガスを通気することにより脱気を行った。その後、亜硫酸水素ナトリウムと過硫酸アンモニウムを重合開始剤として添加し、所定時間攪拌することにより重合を行った。次に、生成した高分子を回収するために食塩濃度が1%となるように食塩を反応液に添加し、白濁した高分子を40℃で遠心分離を行うことにより沈澱物として回収した。この沈澱物を刺激応答性高分子として使用した。刺激応答性高分子の調製においては、生成する高分子の性質と収率に対するNIPAMとMAAの混合比、重

合温度、重合時間などの重合条件の影響を検討した。

## 2. 2 刺激応答性生体触媒の調製

バイオマスの代表である生デンプンの有用物質への変換反応に応用することを目的として、本研究ではグルコアミラーゼ製剤であるダビアーゼ（ダイキン工業）を選択し、<sup>7, 9)</sup> 塩および温度応答性酵素を調製することを試みた。ダビアーゼは次のようにして刺激応答性高分子に固定化した。ダビアーゼを0.1M酢酸緩衝液（pH 5-6）または0.1Mリン酸緩衝液（pH 6-7）に溶解した後、適切な蛋白質濃度に調節した。この酵素溶液に刺激応答性高分子を含む緩衝液を混合し、さらに水溶性カルボジイミドを添加して25℃で3時間攪拌した。生成した固定化酵素を回収するために、濃度が1%となるように食塩を反応液に添加した。白濁した固定化酵素を40℃で遠心分離を行うことにより沈澱として回収し、この沈澱物を刺激応答性ダビアーゼとして使用した。

## 2. 3 酵素活性の測定

遊離および固定化したダビアーゼの活性は、マルトース、デキストリン、可溶性デンプンおよび生デンプンを基質として測定した。反応は0.1M酢酸緩衝液（pH4.5）を用いて、30℃で30分間または1時間行った。

## 2. 4 刺激応答性生体触媒の繰り返し利用

### （1）食塩の濃度変化を利用した繰り返し方法（方法A）

食塩の濃度変化を利用して可溶・不溶可逆ダビアーゼを繰り返し用いながら、可溶性デンプンおよび生デンプンを次のようにして加水分解した。まず、加水分解反応を30℃、食塩を含まない緩衝液中で行った。反応終了後、反応液に濃度が2%となるように食塩を含む緩衝液を添加し、固定化酵素を完全に不溶化した。その後、反応液を30℃で遠心分離し、グルコースを含む上澄液と不溶化した固定化酵素を分離した。沈澱を回収し再溶解した後、食塩を含まない新鮮な基質液を添加し、次の反応を開始した。この反応操作を繰り返した。

### （2）温度変化を利用した繰り返し方法（方法B）

温度変化を利用して可溶・不溶可逆ダビアーゼを繰り返し用いながら、可溶性デンプンおよび生デンプンを次のようにして加水分解した。まず加水分解反応を30℃、0.5%食塩を含む緩衝液中で行った。反応終了後、反応液の温度を36℃にして固定化酵素を完全に不溶化した。その後、反応液を36℃で遠心分離し、グルコースを含む上澄液と不溶化した固定化酵素と分離した。沈澱を回収し再溶解した後、0.5%の食塩を含む新鮮な基質液を添加し、次の反応を開始した。この反応操作を繰り返した。

## 2. 5 分析方法

塩および温度に対する高分子あるいは固定化酵素の溶解性の変化は、それらの懸濁液の

470nmにおける濁度を測定することにより求めた。また、示差走査熱量計（DSC 8230B、リガク）によって、温度による刺激応答性高分子の溶解性変化を調べた。高分子の分子量は粘度法によって求めた。<sup>9)</sup> 高分子溶液の濃度は、その溶液を90℃で24時間乾燥することにより求めた。蛋白質の濃度は、Lowry法を用いて測定した。グルコース濃度はGlucose-CII-Test（和光純薬工業）を用いる酵素法により測定した。

### 3. 結果および考察

#### 3. 1 刺激応答性高分子の調製

Figure 1は本研究で調製した塩応答性高分子の構造を示す。N-isopropyl acrylamide（NIPAM）とmethacrylic acid（MAA）を共重合することにより調製した。ここで、刺激応答に関与しているのはNIPAMの方と考えられる。また、生体触媒としての酵素の刺激応答性高分子への固定化は、MAAのカルボキシル基と酵素のアミノ基を水溶性のカルボジイミドを用いて共有結合させることにより、上述した方法にしたがって行った。

まず、刺激応答性高分子の調製条件について検討した。MAAとNIPAMのモノマー重量比を1対4として重合するときの温度の影響を調べた。重合温度を65℃に設定したとき、温度応答に優れた高分子が生成し、収率も高くなった。しかし、25、45、85℃で重合を行った場合、収率は低くなり、65℃で重合して得られた生成物に比べて温度応答性も悪くなった。この原因については、今後検討する必要がある。重合温度は収率が最も高くなった65℃に設定した。次に、NIPAMとMMAのモノマー比を変えて重合するときの時間の影響を検討した。いずれのモノマー比においても重合開始後、直ちに高分子は生成し、重合開始30分目に収率は高くなり、その後ほとんど増加しなかった。そこで、重合時間は収率がほぼ一定となった1時間とした。

#### 3. 2 刺激応答性高分子の溶解性

Figure 2はMAAとNIPAMのモノマー重量比を1対4として、65℃において1時間、重合して調製した高分子とNIPAMを単独で重合した高分子のそれぞれの溶液（pH4.5）の温度に対する溶解性の変化を示す。NIPAMを単独で重合した高分子液は32℃まで透明であったが、温度の上昇と共に白濁し、約46℃で濁度は最大値を示した。また、示差走査熱量計によって求めた結果から、高分子が相転移する温度の範囲は、濁度から求めた溶解性の変化とよく一致した。

MAAの添加割合を変えることによって温度応答の曲線は変化し、可溶状態から不溶状態に変化する温度の幅も変化した（データ省略）。例えば、MAAとNIPAMの割合を1対9にした場合、温度応答の曲線はなだらかになり、32℃から60℃の範囲で可溶状態から不溶状態に変化した。MAAとNIPAMの比が1対4の条件で重合した高分子は、溶解性が変化する温度の幅が狭く、MAAの比率が高いことから生体触媒が単位高分子当たりにより多く固定化され

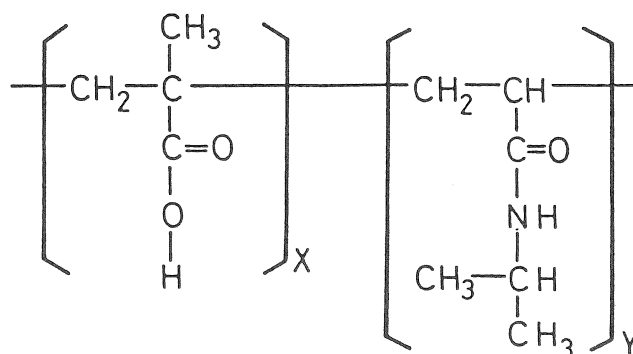


Fig. 1. Chemical structure of MAA-NIPAM copolymer.

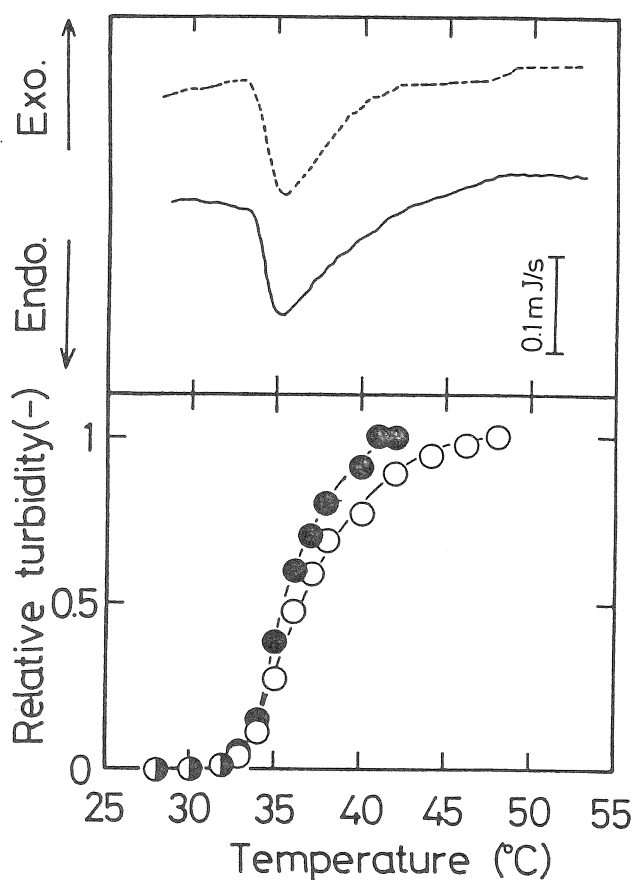


Fig. 2. DSC thermograms and response of solubility of salt- and thermo-responsive polymer and NIPAM homopolymer to change in temperature. The turbidity was determined on the basis of absorbance at 470 nm in the acetate buffer (pH 4.5).

Lines and Symbols : ( ---- ) and ( ● ), Salt- and thermo-responsive polymer ; ( ---- ) and ( ○ ), NIPAM homopolymer.

ると考えられる。そこで、このモノマー比で重合した高分子をダビアーゼ固定化用の担体として使用した。

### 3. 3 刺激応答性高分子の分子量

MAAとNIPAMのモノマー重量比を1対4として、65°Cで1時間、重合して調製した高分子の分子量を粘度法によって求めた。NIPAMを単独で重合した高分子の平均分子量と極限粘度の関係式に基づいて、<sup>9)</sup> 共重合体の平均分子量を算出した結果、22,000であった。

### 3. 4 可溶・不溶可逆生体触媒の調製

次に調製した刺激応答性高分子に生デンプン分解酵素ダビアーゼを固定化する条件について検討した。Figure 3は刺激応答性高分子にダビアーゼを固定化する時のpHの影響を示す。固定化は3時間、25°Cにおいて、それぞれのpHにおいて行った。高分子当たりに結合する酵素蛋白質量は、固定化するとき用いた緩衝液の種類の影響を受けたが、pHが高くなるにつれて増加した。結合した酵素蛋白質当たりの比活性は、pHが6.5のときに最高値(約1.6

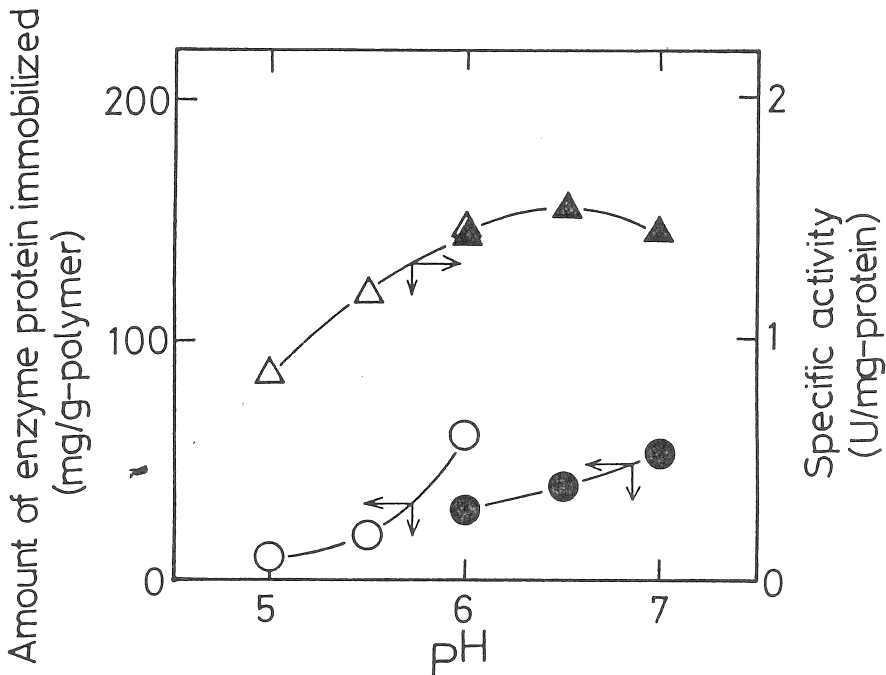


Fig. 3. Effect of pH for immobilization of the activity of D-MN. Open and closed keys show 0.1M acetate buffer (pH 5.0-6.0) and 0.1M phosphate buffer (pH 6.0-7.0), respectively.

Symbols: (○, ●), amount of enzyme protein immobilized ; (△, ▲), specific activity.

U/mg-protein) を示した。結局、酵素の固定化は高分子当たりの酵素活性が最大となった pH6.5 において行った。

次に、高分子当たりに添加するダビアーゼ量の影響を検討した結果、高分子当たり結合する酵素蛋白質量と全活性は、酵素添加量の増加と共に増加し、高分子1グラム当たり1グラムの酵素を添加した場合、最大となった。したがって、酵素の固定化はその割合でそれぞれ添加して行った(データ省略)。

### 3. 5 可溶・不溶可逆生体触媒の性質

Table 1は遊離のダビアーゼと刺激応答性高分子に固定化したダビアーゼについて、基質特異性を比較した結果を示す。比較のために水に不溶な担体にダビアーゼを固定化した結果、すなわち、CM-Toyopearlに固定化したダビアーゼの結果も合わせて示す。可溶性基質であるマルトース、デキストリンおよび可溶性デンプン、不溶性基質である生デンプンに対する活性について比較した。刺激応答性高分子に固定化した酵素の活性は、水溶性の基質の場合、遊離酵素と同様に高くなった。高分子基質である可溶性デンプンを用いた場合、水に不溶な担体に固定化した酵素の活性は遊離酵素の活性の46%であるのに対して本固定化酵素は90%であった。また、固体基質である生デンプンに対する本固定化酵素の活性は、水に不溶な担体に固定化した酵素の活性に比べて高く、遊離酵素の活性の48%であった。したがって、本固定化酵素は、可溶性の高分子基質および固体基質に対して有効にはたらく固定化酵素であることがわかった。

Figure 4は、食塩が共存するときに固定化ダビアーゼの温度応答性を調べた結果を示す。Figure 2において示した高分子だけの溶液と比較して、ダビアーゼを固定化しても溶解性の応答は、ほとんど変化しなかった。すなわち、応答する温度範囲は32°Cから42°Cであり、高分子の溶解性の応答とほとんど同じであった。また、固定化酵素の温度応答に対する食塩濃度の影響を検討した。食塩濃度が高くなるにつれて温度に対する応答が鋭くなり、応答する温

TABLE 1. Substrate specificity of D-MN

Dabiase preparation	Specific activity (U/mg-protein)			
	Maltose	Dextrin	Soluble starch	Uncooked starch
Native	3.32 (100) <sup>1)</sup>	11.7 (100)	11.8 (100)	3.27 (100)
D-MN <sup>2)</sup>	3.03 (91)	10.6 (91)	10.9 (92)	1.56 (48)
D-CMT <sup>3)</sup>	2.32 (70)	6.79 (58)	5.43 (46)	0.85 (26)

The reaction was carried out at 30°C and pH 4.5 (0.1 M acetate buffer).

1) Relative activity when the activity of the native Dabiase was expressed as 100%.

2) Dabiase immobilized on MAA-NIPAM.

3) Dabiase immobilized on CM-Toyopearl.



度範囲が低温側に移動した。食塩濃度が1%増加するにつれて、溶解性が変化する温度は約4.7°Cずつ低下した。次に、ナトリウム塩または塩化物が共存するときの固定化酵素の溶解性の応答について検討した。Figure 5はそれらの結果を示す。硫酸ナトリウムが共存する場合には、応答は18°Cから26°Cの温度範囲でおこった。食塩や硝酸ナトリウムが共存する場合に比べて、応答範囲が低温側へ移動したのはナトリウムイオンの濃度に関係していると考えられる。一方、6種類の塩化物についてナトリウム塩の場合と同様に検討したが、温度応答の範囲および応答性はほとんど変化しなかった。各種塩が共存するときの固定化酵素の刺激応答に関しては、今後詳細に検討する必要がある。

以上の結果より、本可溶・不溶可逆酵素を30°Cの加水分解反応に繰り返し利用するためには2通りの方法が考えられる。1つは食塩濃度の変化による繰り返し方法、もう1つは温度変化による繰り返し方法である。

### 3. 6 可溶性デンプンの繰り返し加水分解

Figure 6Aは、塩刺激に対する応答を利用する方法Aによって、固定化ダビアーゼを繰り返し用いて0.5%の可溶性デンプンを加水分解した結果を示す。1回の反応終了ごとに、温度を30°Cに保持した状態で食塩濃度を2%にして酵素を不溶化して回収し、次の反応に用いた。反応を繰り返すごとに相対活性は徐々に低下したが、30回目まで繰り返した後でも1回目の

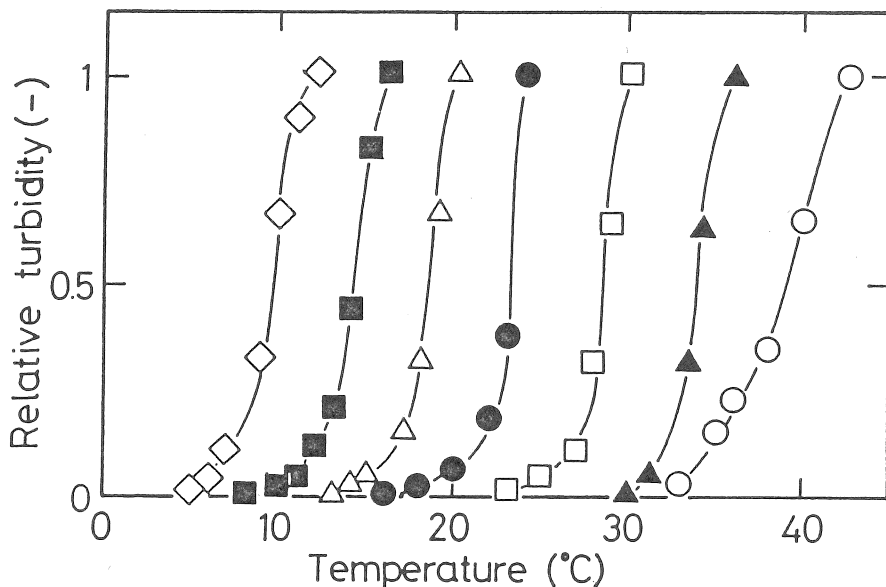


Fig. 4. Response of D-MN solubility to the change in the temperatures and effect of NaCl concentration on its solubility response. The NaCl concentrations in 0.1M acetate buffer (pH 4.5) with D-MN : (○), 0%; (▲), 0.5%; (□), 1%; (●), 2%; (△), 3%; (■), 4%; (◇), 5%.

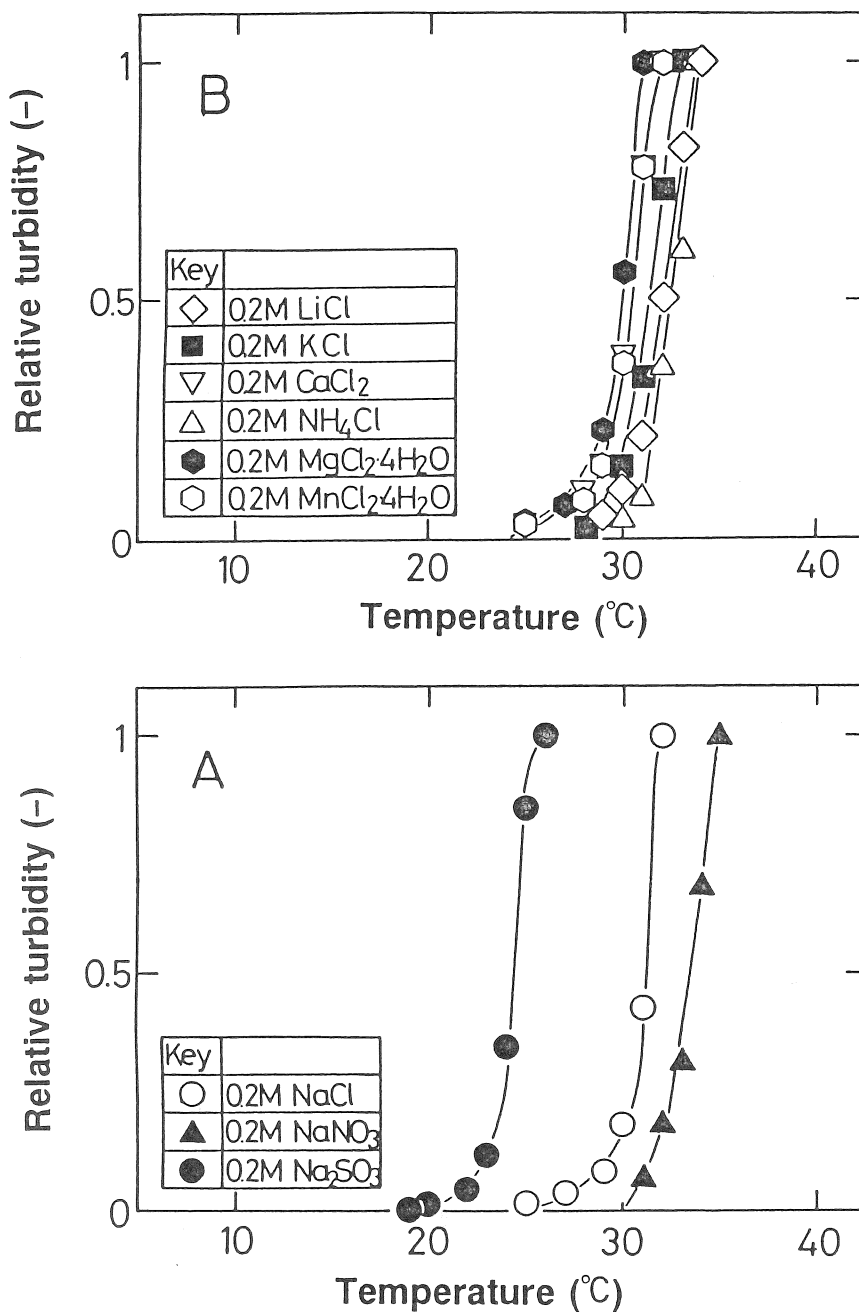


Fig. 5. Response of D-MN solubility to the change in the temperatures and effect of addition of different salts on its solubility response.

A: 0.2M Sodium salts, (○), NaCl; (▲), NaNO<sub>3</sub>; (●), Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>.

B: 0.2M Chlorides, (◇), LiCl; (■), KCl; (▽), CaCl<sub>2</sub>; (△), NH<sub>4</sub>Cl; (●), MgCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O; (○), MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O.

活性の95%以上存在していた。また、30回加水分解反応を繰り返した後の固定化酵素の蛋白質当たりの比活性は、ほとんど低下しなかった。加水分解反応の繰り返しに伴う相対活性の低下は、繰り返し操作中の固定化酵素の不完全な回収が主な原因と考える。

Figure 6Bは、温度刺激に対する応答を利用する方法Bによって、固定化ダビアーゼを繰り返し用いて0.5%の可溶性デンプンを加水分解した結果を示す。反応液には固定化ダビアーゼの温度応答性を高めるために食塩を0.5%添加した。1回の反応終了ごとに温度を30°Cから36°Cに上げて固定化酵素を不溶化して回収し、次の反応に用いた。反応を繰り返すごとに相対活性は徐々に低下したが、30回繰り返した後でも1回目の活性の約80%以上存在していた。また、30回加水分解反応を繰り返した後の酵素比活性は、繰り返し反応を行う前の90%以上であり、酵素の比活性の低下はほとんど認められなかった。加水分解反応の繰り返しに伴う相対活性の低下は、方法Aの場合と同様に、繰り返し操作において固定化酵素が完全に回収できなかったことが主な原因と考えられる。

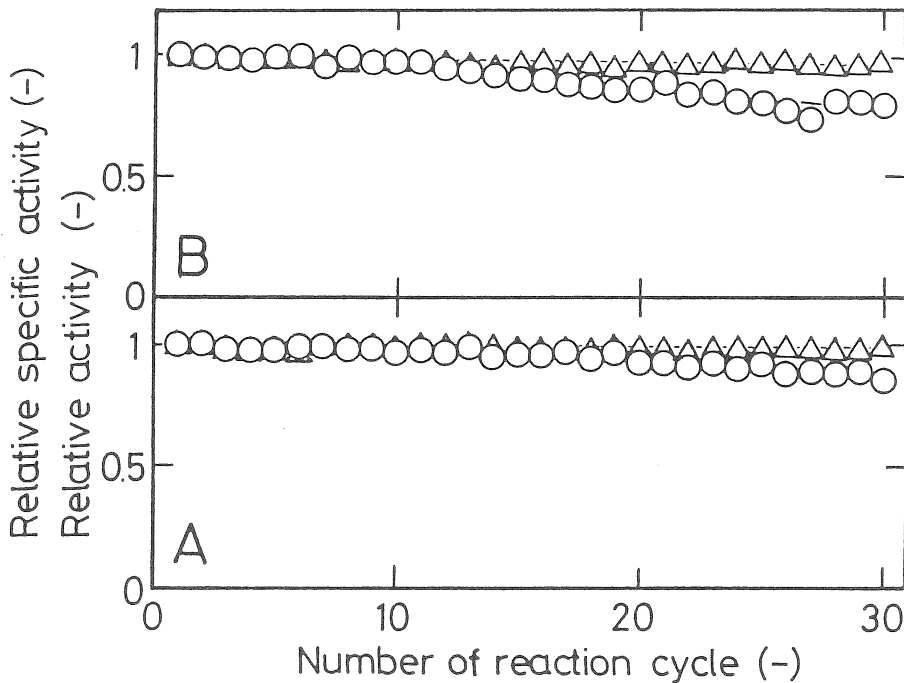


Fig. 6. Activity and stability of D-MN in repeated hydrolysis of soluble starch. A: D-MN was batchwise insolubilized at 30°C by adjusting NaCl concentration of the reaction mixture to 1% (method A). B: D-MN was batchwise insolubilized by elevating the temperature of the reaction medium with 0.5 % NaCl from 30°C to 36°C (method B). The relative activity (○) and the relative specific activity per protein (△) of the first batch reaction were expressed as 1.

### 3. 7 生デンプンの繰り返し加水分解

Figure 7Aは、塩刺激に対する応答を利用する方法Aによって、固定化ダビアーゼを繰り返し用いて1%の生デンプンを5回加水分解した結果を示す。また、Figure 7Bは、温度刺激に対する応答を利用する方法Bによって、1%の生デンプンを5回加水分解した結果を示す。それぞれの繰り返し操作は、可溶性デンプンの場合と同じようにして行った。方法Aにおいては、酵素の活性の低下はほとんど認められなかった。一方、方法Bにおいては、加水分解を繰り返すごとに相対活性はわずかに低下したが、5回反応繰り返した後でも1回目の活性の74%存

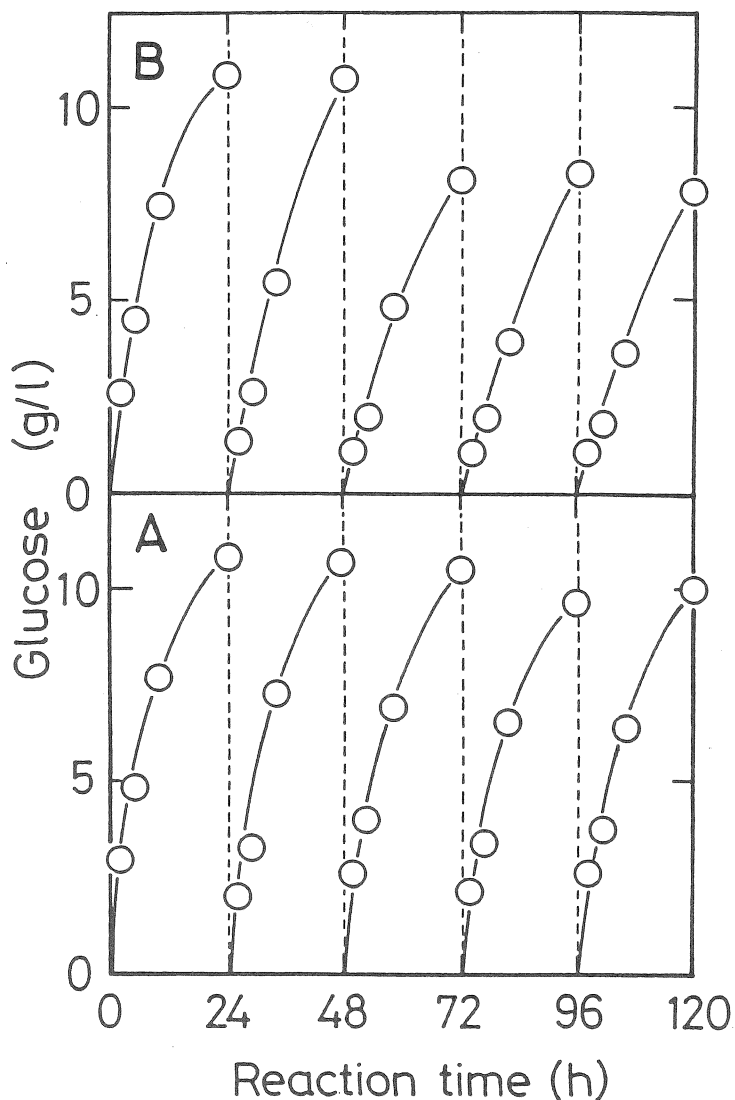


Fig. 7. Repeated hydrolysis of uncooked starch with D-MN.  
 A: Repeated hydrolysis was carried out by the method A.  
 B: Repeated hydrolysis was carried out by the method B.

在していた。繰り返し利用方法の相違による活性の差は、ダビアーゼの温度と食塩濃度の変化に対する安定性の違いに起因すると考えられる。しかし、一般的にどちらの繰り返し利用方法が適しているかは、その酵素反応系と酵素の性質に依存して変わると考えられる。

#### 4. 今後の課題

NIPAMとMAAを共重合することにより刺激応答性高分子を調製することができた。本高分子を担体として用いてデンプン分解酵素を固定化することにより、温度変化で溶解性が調整できる刺激応答性固定化生体触媒を調製できた。さらに、本固定化生体触媒を食塩濃度の変化あるいは温度の変化を利用して、繰り返し用いることにより可溶性デンプンおよび生デンプンを加水分解できた。

本研究において調製したNIPAM-MAA共重合体は、NIPAM-GMA共重合体に比べて、1) 刺激に対する応答速度、2) 共重合体当たりの酵素蛋白質の結合量、3) 操作安定性などの面で優れていた。また、NIPAM-MAAに固定化した酵素の活性は、可溶性デンプンばかりでなく生デンプンを基質としたときにも比較的高かった。

今後は、NIPAM-MAA共重合体を基準として、より高性能な刺激応答性高分子を調製し、いろいろな生体触媒の固定化に利用する予定である。

#### 参考文献

- 1) K.Hoshino, M.Taniguchi, Y.Netsu, and M.Fujii : *J.Chem.Eng.Japan*, **22**, 54 (1989).
- 2) K.Hoshino, M.Taniguchi, Y.Netsu, and M.Fujii : *Agric.Biol.Chem.*, **53**, 1961 (1989).
- 3) M.Taniguchi, M.Kobayashi, and M.Fujii : *Biotechnol.Bioeng.*, **34**, 1092 (1989).
- 4) M.Taniguchi, S.Tanahashi, and M.Fujii : *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, **33**, 629 (1990).
- 5) M.Taniguchi, K.Hoshino, K.Watanabe, K.Sugai, and M.Fujii : *Biotechnol.Bioeng.*, **39**, 287 (1992).
- 6) K.Hoshino, M.Taniguchi, M.Katagiri, and M.Fujii : *J.Chem.Eng.Japan*, **25**, 569 (1992).
- 7) F.W.Bergmann, J.Abe, and S.Hizukuri : *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, **27**, 443 (1988).
- 8) J.Abe, W.F.Bergmann, K.Obata, and S.Hizukuri : *Appl.Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 447 (1988).
- 9) S.Fujishige : *Polymer J.*, **19**, 297-300 (1987).

## Preparation of a Salt-Responsively Soluble-Insoluble Enzyme and Its Application to Hydrolysis of Biomass

Masayuki Taniguchi<sup>1</sup> and Kazuhiro Hoshino<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Department of Chemistry and Chemical Engineering, Niigata University.*

<sup>2</sup> *Department of Chemical and Biochemical Engineering, Toyama University.*

### Summary

A copolymer of methacrylic acid (MAA) and *N*-isopropyl acrylamide (NIPAM) was used as a novel reversibly soluble-insoluble support whose solubility changes depending on the NaCl concentration as well as the temperature of the solution. Amylase (Dabiase K-27) immobilized covalently on the salt- and thermo-responsive polymer showed good response of solubility : The immobilized enzyme (D-MN) was in a soluble state below 32°C, but in insoluble form above 42°C. D-MN in a soluble state has a high specific activity for hydrolysis of soluble starch or uncooked starch. Adding 0.5% NaCl to a buffer solution (pH 4.5) with D-MN, the solubility response of D-NM to changes in the temperature of the solution was more sensitive than that in the buffer solution without NaCl. D-MN was used successively for repeated hydrolysis reactions of soluble and uncooked starches, in which D-MN was insolubilized by adjusting either the temperature of a reaction mixture with 0.5% NaCl from 30°C to 36°C or the NaCl concentration of a reaction mixture at 30°C from 0% to 1%. In the repeated hydrolysis, glucose was produced successively from soluble and uncooked starches and D-MN can be repeatedly used after recovering from a reaction product by centrifugation at the end of each batchwise hydrolysis.