previous paper, were studied in relation to the oxidation-reduction equilibria of the media. The fact that there were two types of carbon source in the media, i. e. glucose type and pyruvic acid type, in concerning with effects of thiol compounds was explainable by the difference of optimal Eh values for the consumption of substrate between stages before and after of pyruvic acid formation. This view was supported by experiments examining the relationship between the substrate-*E. coli*-oxidation-reduction indicator systems as indicated in Tables 1 and 2, and was based on the presumption that there exists optimal oxidation-reduction potential in the overall reaction including several stages in the metabolic pathway of carbon sources.

2. Quantitative evaluation of antagonism between thiol compounds and mercuric chloride was made by the growth of *E. coli*. The results obtained with aid of the curve (Fig. 6) showing lag-concentration of thiol group were presented in Fig. 7.

種子発芽時に於ける窒素代謝の研究 (第 1 報)

えんどう発芽時のアミド並びにアミノ酸の消長に就いて

白川正治, 大宝 明 (福岡女子大学家政学部)

昭和 30 年 11 月 28 日 受理

Studies on the Nitrogen Metabolism in Plant Germination. Part I.

Variation of Amide and Amino Acid Contents during the Germination of Pea Plant.

By Masaharu SHIRAKAWA and Akira OTAKARA

(Fac. Domestic Science, Fukuoka Woman's University)

植物種子の発芽時に於ける N 化合物の活潑な分解及び合成には多数の酵素系が関与し、而もその代謝経路は光の作用によりかなり変化する。即ち炭水化物及び脂肪等の呼吸源が十分に存在するか、或いは光合成を行つているか何れかの場合には貯蔵蛋白質の分解により生じたアミノ酸は蛋白質に再合成される。併しアミノ酸が呼吸源として利用される様な条件下、例えば暗所発芽等の場合にはグルタミン、アスパラギンの如きアミドが蓄積される。これらのアミドは植物を明所に移すことにより減少する。これ等の事実は既に古く SCHULZE, CHIBNALL, VICKERY 等により認められ⁽¹⁾、植物界に広く分布するアスパラギン及びグルタミンの N 代謝に於ける重要な役割が推定された。その後の生化学の飛躍的發展と共にこの問題も次第に明らかにされつつあるが^(2,3)、併しアミノ酸の N 代謝に関与する酵素系の中、酸化的脱アミノ酵素及びアミノ基転移酵素とアミドの特異的分布の關係に關しては尚不明の点が少ない。

筆者等は発芽種子に於けるアミドの蓄積が光照射により或程度迄調製されることに着目し、アミノ基転移反応と酸化的脱アミノ反応のアミド合成への関与を定量的に追求する目的で本研究に着手した。本報ではえんどう種子の発芽に伴う遊離アミノ酸及びアミドの量的変化を検討した結果に就いて記述する。

実 験 方 法

グリーンピースを 1 夜水に浸漬して均一なものを撰び、予め殺菌洗滌した砂土に播き、毎日一定量の蒸留水を供給する。播種日を発芽過程の第 1 日として室温 (15~20°) で 10~14 日迄の試料に就いて測定した。通常 2 日目には完全に発根し 3 日目より発芽しはじめた。測定に際しては 5~30 個体を取り胚軸の子葉附着点より肉眼的にメスで切り分ける⁽⁴⁾。即ち子葉 (Cotyledon) と子葉以外の幼葉、胚軸、幼根等を一緒にした胚組織 (以下単に embryo 部と呼ぶ)* に分けて諸成分の定量を行つた。

(1) 個体重量 : 5~10 個体を器官別に分け附着水を濾紙上で除き 30 分間放置後秤量し、これを湿重量とし、常法により 110° で乾燥して乾重量を求めた。

(2) 抽出液の調製 : 生の試料を 10 倍量の蒸留水で海砂と共に磨碎しガーゼで濾過、濾液を遠沈 (3,500 r. p. m.; 20 min) して抽出液を調製した。

(3) 全窒素 : 抽出液 2 ml につき Kjeldal 法を行つた。

* 太田氏の“メバエ”と称する部に相当。

(4) アミド態窒素：抽出液を 80° で 5 分間加熱し直ちに冷却遠沈して除蛋白し、上液の一定量 (5 ml) を採り、VICKERY 等の方法⁽⁶⁾⁽⁶⁾に従い、 $N-H_2SO_4$ で 100° で 3 時間加水分解する。生成するアンモニアを FOLIN 管で通気蒸溜し、 $N/25 H_2SO_4$ に捕獲滴定して全アミド N を求めた。グルタミンの定量は磷酸・硼酸緩衝液 (pH 6.5) で 2 時間 100° で加水分解した。アスパラギンは両者の差より求めた。

(5) 遊離アンモニア態窒素：上述の方法による。

(6) 遊離アミノ酸：試料を 10 倍量の 87% アルコールで抽出 (終濃度約 80%)、遠沈、上液を濃縮して 0.025 ml を濾紙上に採り二次元ペーパークロマトグラフを行つた。即ち 20×20 cm の濾紙 (東洋濾紙 No. 50) で水飽和フェノール及び醋酸ブタノール系で二次元を行い、発色にはニンヒドリンを用いた。

実験結果及び考察

(1) 成長曲線：明暗所に於ける成長曲線を Fig. 1 及び 2 に示した。暗所発芽では明所の場合に比較して新鮮重量の増加が著しく大であるが乾燥重量には大して差がない。以下の定量値はこの成長曲線に基づいて個体当りに換算した。

Fig. 1. Growth-Curves of Pea Seedling during Germination (in Dark)

Fig. 2. Growth-Curves of Pea Seedling during Germination (in the Light)

(2) 全窒素の変化：Table 1 に示した如く乾燥重量の減少が著しくなる 7~10 日で子葉の全窒素の減少が明瞭に認められ、同時に胚の全窒素が急に増加する。初期に見られる子葉の全窒素の変動は個体差によるものと考えられる。

TABLE 1. Variation of the Nitrogen Content of Pea Seedling during Germination in the light or dark.

In the light			In dark		
Days of germination	Total N (mg.)		Days of germination	Total N (mg.)	
	Cotyledon	Embryo		Cotyledon	Embryo
0	6.09	0.32	0	6.09	0.32
1	5.60	0.37	1	5.50	0.32
3	5.26	0.46	3	5.51	0.50
5	5.63	0.68	4	5.68	0.90
7	5.38	0.99	6	5.67	0.98
10	5.11	2.05	8	5.70	1.86
12	4.02	2.61	10	4.14	2.85
			12	3.69	3.21
			14	3.60	3.84

られない。併しアスパラギン ($Asp-NH_2$) とグルタミン ($Glu-NH_2$) の変化は頗る興味がある。子葉では最初減少するアミドは大部分 $Asp-NH_2$ であり、最初殆んど含有されない $Glu-NH_2$ が徐々に増加して $Asp-NH_2$ の量に近づき、特にこの傾向は明所発芽に於て著しく両者が殆んど等しくなる時がある。兎に角子葉では $Asp-NH_2$

(3) アミド態窒素の変化：アミド態窒素の量は明、暗所で明らかに異つている (Fig. 3, 4)。明暗何れの場合にも胚のアミド態窒素は成長と共に増加する。暗所では特に著しく 14 日間で全窒素の約 20%、個体乾燥重量の約 10% (全アミドとして) 位に達する。SCHULZE のルーピン種子に就いての 25% に比べるるとかなり小さい。これは品種によりかなり差があるものと思われる。子葉では発芽初期 (発根まで) に一度減少して後やや増加し激しい変化は見

Fig. 3. Variation of Amide Nitrogen of Pea Seedling during Germination (in Dark)
— Cotyledon Embryo

Fig. 4. Variation of Amide Nitrogen of Pea Seedling during Germination (in the Light)

利用されるものと考えられる。又子葉に於て減少したアミドはそのまま或いは脱アミドされて後胚に送られ、アミドに再合成されると思われる。従つて子葉の全窒素の減少が著しい7~10日以後に於て、胚に於ける相応したアミドの蓄積が見られる。豌豆種子に於て glutamine synthase が既に証明されていることは⁽⁷⁾、発芽初期に子葉に於て Glu-NH_2 の蓄積が見られることと比べて興味がある。Asp- NH_2 の合成に関しても同様な酵素の存在が当然期待される*。尚明暗所発芽を通して遊離アンモニアの変化は著しくなかつた。

(4) 遊離アミノ酸のクロマトグラフ：子葉及び胚共に Fig. 5 の如く約 10 個のスポットをもつた二次元

TABLE 2. Free Amino Acids of Pea Seedling during Germination (in Dark)
Days of Germination Amino Acid detected

		Cys.	Asp.	Glu.	Gly.	Asp-NH ₂	Glu-NH ₂	Ala.	Tyr.	Val.	Leu.	Arg.+?
Cotyledon	0	+	+	##	+	+	±	±	±	+	+	+
	1	+	+	##	+	+	±	±	±	+	+	+
	3	±	+	##	+	+	+	+	±	+	+	+
	4	±	+	##	+	+	±	±	±	+	+	+
	6	±	+	##	+	+	±	±	±	+	+	+
	8	±	+	##	+	+	±	±	±	+	+	+
	10	—	+	##	+	±	±	±	—	+	+	+
Embryo	12	—	+	##	+	±	±	±	±	+	+	+
	14	—	+	##	+	±	±	±	—	+	+	±
	4	—	##	+	+	+	+	±	+	+	+	±
	6	—	##	+	+	+	+	±	+	+	+	±
	8	—	##	+	+	±	±	±	+	+	+	—
	10	—	##	+	+	±	±	±	+	+	+	—

large, # middle, + small, ± not sure, — not detectable.

Abbreviations; Cys.: Cystine, Asp.: Aspartic acid, Glu.: Glutamic acid, Gly.: Glycine
Asp-NH₂: Asparagine, Glu-NH₂: Glutamine, Ala.: Alanine, Tyr.: Tyrosine
Val.: Valine, Leu.: Leucine, Arg.+?: Arginine+unknown.

Fig. 5. Paper Chromatography of Amino Acids in Pea Seedling

1. Cystine
2. Aspartic Acid
3. Glutamic Acid
4. Glycine
5. Asparagine
6. Glutamine
7. Alanine
8. Tyrosine
9. Valine
10. Leucine
11. Arginine+unknown

の減少時にも Glu-NH_2 の蓄積が見られるのは興味がある。これらの関係は次のクロマトグラフによつても認められ、又アスパラギン酸 (Asp), グルタミン酸 (Glu) の変化にも関係があるようである。これらの事実は発芽初期に先ず子葉のもつ非蛋白態窒素が利用され、次いで貯蔵蛋白の分解が旺んになるに従いこれが

図が得られる。発芽時に於ける各アミノ酸のスポットの強さを Table 2 及び 3 に示す。特に Asp- NH_2 , Glu- NH_2 , Asp, Glu 及びアラニンのスポットが強く、その外にはグリシン、バリン、ロイシンが発芽過程を通して常に見られ、シスチン及びチロシンも僅かながら存在するよう

* 最近新しい酵素の証明がなされた; G. C. WEBSTER, J. E. VARNAR: *J. Biol. Chem.*, 216, 91 (1955).

TABLE 3. Free Amino Acids of Pea Seedling during Germination (in the Light)

Days of Germination		Amino Acids detected										
		Cys.	Asp.	Glu.	Gly.	Asp-NH ₂	Glu-NH ₂	Ala.	Tyr.	Leu.	Val.	Arg. +?
Cotyledon	0	+	±	≡	±	+	±	≡	—	+	+	+
	1	+	+	≡	+	+	+	≡	±	+	+	≡
	2	±	+	≡	+	+	+	≡	±	+	+	≡
	3	±	≡	≡	≡	±	≡	≡	±	+	+	+
	5	—	+	≡	≡	±	≡	≡	±	+	+	+
	7	—	+	≡	≡	+	+	≡	±	±	+	+
	10	—	±	≡	≡	≡	+	≡	±	+	+	±
Embryo	3	—	≡	≡	≡	≡	≡	≡	—	±	+	—
	5	—	≡	≡	+	≡	+	≡	—	—	+	—
	7	—	≡	≡	+	≡	±	≡	+	—	+	—
	10	—	≡	+	+	≡	±	≡	+	—	±	—

Abbreviation and signs of intensity are the same as in Table 2.

である。スポット 11 はアルギニン及び

γ-アミノ酪酸に相当するようであるがはつきりしない。γ-アミノ酪酸に就いては同定を行っていないが、このアミノ酸の存在が既に豌豆で証明されていること⁽⁸⁾

⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾及びその R_F の

比較などよりこのアミノ酸に相当するものと想像した。特にこのアミノ酸のスポットが Glu が多い子葉に於てのみ見られること等とも関連しているようである。これらのアミノ酸の変化を以下に概括する。

i) 発芽過程を終るに従い遊離アミノ酸のスポットに変化が見られ、一般に Asp-NH₂ が Glu-NH₂ よりも多いが、子葉では Glu-NH₂ が明暗所共に発芽初期に増加する傾向が見られる。

ii) 興味ある現象は Asp と Glu とが子葉と胚とで逆の関係にあることで、胚では Asp が多く子葉では逆に Glu が多い。これらは相当するアミドの変化と対応しており、各アミノ酸よりアミドが合成されると考えるのに都合がよいようである。又スポット 11 が胚に於て殆んど認められないので、Glu の脱炭酸は子葉に於てのみ強いようである。

iii) アラニンは子葉及び胚共に常に多く検出されるが胚に於て特に著しい。Asp, Glu 及びアラニンのスポットが全発芽過程に特に顕著であるのは、次報で述べる如く transamination に関連しており蛋白の分解合成の過程で常に見られるからであろう。これら三つのアミノ酸が関与する transamination が発芽時に於て特に活性であるという多くの報告^(11,12,13,14,15)もこの事実を裏付けるものである。

iv) グリシリン、バリン、ロイシン等のその他のアミノ酸は何れも胚より子葉に多く、チロシンのみは逆に胚に多い。尚これらアミノ酸のクロマトは各器官の抽出液一定量を用いたので、個体当りに換算された絶対量は生長の盛んな胚では発芽と共に更に増加していることになる。

v) 明所及び暗所発芽両者の各アミノ酸の消長には大きな差異が見られないが、唯暗所の方が遊離アミノ酸が多いようである。

以上の外に最近 VIRTANEN 一派の人達は豌豆発芽種子で γ-glutamylalanine⁽¹⁴⁾、その他の緑色植物で数種の新アミノ酸を検出しているので⁽¹⁷⁾、これらのアミノ酸の存在に就ては更に検討を要する。

(5) 暗所発芽後に明所にて生長させた場合の窒素の変化：10日間暗所で発芽させた幼植物をそのまま暗所にて或は明所に移して生長させた場合の窒素変化を Table 4 に示す。

TABLE 4. Effect of the Light on the Nitrogen Balance during Germination.

(After 10 days' etiolation, seedlings were grown further for 4 days in dark or in the light and analysed.)

Nitrogen	Tissues	After 10 days' etiolation			After next 4 days in dark		After next 4 days in the light	
		mg.			mg.		mg.	
Total N	Cotyledon	4.14			3.60		3.67	
	Embryo	2.58			3.84		3.71	
Total amide N	Cotyledon	0.161	0.491		0.175	0.906	0.220	0.677
	Embryo	0.330			0.731		0.457	
Amide N of glutamine	Cotyledon	0.040	0.218		0.045	0.275	0.062	0.175
	Embryo	0.178			0.230		0.113	
Amide N of asparagine	Cotyledon	0.121	0.273		0.130	0.631	0.158	0.502
	Embryo	0.152			0.501		0.344	

この時の生長曲線は既に前に観察した通りであり、暗所にそのまま生長させた場合は徒長する。全窒素は殆んど変化がないが、アミド態窒素は明らかに暗所発芽を続けた場合に著しく蓄積する。明所に移した場合も蓄積したアミドの減少は見られず、暗所に比べて少ないが依然蓄積を続けるようである。これは子

葉の貯蔵蛋白が非常に多いために蛋白分解によるアミドの供給も著しいからであろう。又子葉に於て度々見られた如く明所の方が却つてアミドの量が多いことから背ける。併し発芽植物 1 個体としてはやはり暗所に於てアミドの蓄積が大きい。又二つの場合の遊離アミノ酸のクロマトグラフは特別に差異は見られなかつた。

以上の如く外部から栄養分を供給せず而も暗所で発芽させた場合、即ち heterotrophic な条件下では、貯蔵蛋白の分解によつて供給されたアミノ酸は、胚に於てはかなりの量のアミドとして蓄積される。又遊離アミノ酸のクロマトグラフより発芽幼植物に於ては transamination が窒素代謝で主要な役割を演じていることが容易に想像される。一方 transamination によつて生じたアミノ酸からアミドの蓄積が起るためには、アミノ酸の直接的脱アミノ反応によつてアンモニアが供給されることが必要である。併し高等植物での L-アミノ酸の酸化的脱アミノは L-グルタミン酸脱水素酵素以外は殆んど知られていない。そこで胚に於けるアミドの蓄積と窒素代謝に関与する酵素系を考える時、transamination によるアミノ基転移と共に酸化的脱アミノによるもう 1 個のアミノ基の供給が問題になる。又アミドと α -ケト酸との transamination-deamidation reaction に関する動物組織を用いた研究⁽¹⁵⁾、及びその逆反応によるアミドの合成⁽¹⁶⁾なども検討を要する問題である。更にアミドの生合成の直接的な証明はこれらの現象を解明するのは是非必要であり、われわれは今後このような方向に問題を取り上げて行きたいと思う。

要 約

- 1) 暗所で発芽させた豌豆幼植物に於ては胚に著しいアミドの蓄積が見られ、その中アスパラギンがグルタミンよりも多い。
- 2) 子葉中のアスパラギンは蛋白態窒素に先立つて利用されるので、発芽初期には急激な減少が見られるがその後は殆んど変化がない。又グルタミンは子葉で発芽初期に合成されてやや増加し、丁度アスパラギンの減少と逆の関係にある。
- 3) 発芽時の遊離アミノ酸として約 10 個をクロマトグラフにより検出したが、全発芽過程で特に顕著に認められるのは transamination に関与したアスパラギン酸、グルタミン酸及びアラニンである。
- 4) 胚と子葉とではアスパラギン酸とグルタミン酸とが量的に逆の関係にあり、胚ではアスパラギン酸が多く子葉ではグルタミン酸が多い。両アミノ酸は何れも各器官に於て蓄積の傾向にあるアミドに対応している。
- 5) 暗所発芽後明所で生長させたものとそのまま暗所発芽を続けたものと比較して、以上に述べた結果と同じ傾向を認めることが出来た。

本研究を行うにあたり実験に協力された馬渡京子、大庭さち子の両嬢に深謝する。尚本研究は文部省科学研究費の補助により行われたものである。

(1) J. BONNER : Plant Biochemistry, Acad. Press, (1950), 299 pp.	(10) J. L. AUCLAIR, J. B. MALTAIS : <i>Nature</i> , 170, 1114 (1952).
(2) P. K. STUMPF : in Phosphorous Metabolism, Vol. 2, (1952), 56 pp.	(11) 赤沢 堯, 舟橋三郎, 瓜谷郁三 : 農化, 27, 849 (1953).
(3) H. A. KREBS : in Chemical Pathway of Metabolism, Vol. 2, (1954), 140 pp.	(12) M. J. K. LEONARD, R. H. BURRIS : <i>J. Biol. Chem.</i> , 170, 701 (1947).
(4) 太田行人 : 標準生化学実験法, 文光堂 (1953), 560 pp. ; 科学 23, 61 (1953).	(13) D. G. WILLSON, K. W. KING, R. H. BURRIS : <i>J. Biol. Chem.</i> , 208, 863 (1954).
(5) G. W. PUCKER, H. B. VICKERY, C. S. LEAVENWORTH : <i>Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.</i> , 7, 152 (1935).	(14) A. I. VIRTANEN, Ann-M. BERG : <i>Acta Chem. Scand.</i> , 8, 1089 (1954).
(6) H. B. VICKERY, G. W. PUCKER, H. E. CLARK : <i>Biochem. J.</i> , 29, 2710 (1935).	(15) A. MEISTER, H. A. SOBER, S. V. TICE, P. E. FRASER : <i>J. Biol. Chem.</i> , 197, 319 (1952).
(7) W. H. ELLIOTT : <i>C. A.</i> , 47, 4389 f (1949); <i>J. Biol. Chem.</i> , 201, 661 (1953).	(16) A. MEISTER, P. E. FRASER : <i>J. Biol. Chem.</i> , 210, 37 (1954).
(8) T. G. HYDE : <i>Biochem. J.</i> , 55, xxi (1953).	(17) A. I. VIRTANEN, E. UKSILA, E. J. MATIKKALA : <i>Acta Chem. Scand.</i> , 8, 1085, 1091, 1290, 1725 (1954).
(9) J. K. MIETTINEN, A. I. VIRTANEN : <i>Acta Chem. Scand.</i> , 7, 289 (1953).	

Summary

Amides, such as asparagine and glutamine, accumulated chiefly in the embryo (plumule, young stem and radicle) of etiolated pea seedlings; the former accumulated much more than the latter.

Asparagine content of cotyledon decreased rapidly in the early stage of germination and

then remained unchanged in the dark and in the light. On the contrary, glutamine, which was found only in small amount in the original seeds, increased slowly at the same stage.

About ten free amino acids were detected in both cotyledon and embryo at all stages of germination; aspartic acid, glutamic acid and alanine, which seem to be concerned in, transamination reaction in seedlings, were the most remarkable.

Aspartic acid and glutamic acid, which seem to be closely related to the accumulation of the corresponding amides were found predominantly in embryo and cotyledon respectively.

ペニシリン醗酵に関する研究 (第 5 報)

各種植物油並に脂肪酸のペニシリン生成に及ぼす影響

野口祐一, 荒尾 修, 重藤 稔, 栗原純夫 (協和醗酵工業株式会社富士工場)

昭和 30 年 10 月 29 日 受 理

Studies on Penicillin Fermentation. Part V.

Effects of Vegetable Oils and Fatty Acids on Penicillin Yield.

By Yuichi NOGUCHI, Osamu ARAO, Minoru SIGETO and Sumio KURIHARA

(Kyowa Fermentation Industry Co., Ltd., Fuji Plant)

緒 言

前報⁽³⁾⁽⁴⁾で著者らは, *Pen. chrysogenum* Q-176 pigmentless saltant を親株とする 1 変異株 H-512 を用い、その炭素源利用に着目し、高単位ペニシリン醗酵を得るには、菌の生理上培養初期に急速に菌を増殖させ、その後徐々に炭素源を feed し半飢餓状態に維持することが必要である事を認めた。

Feed substance としては大豆油がすぐれているが、これは high aeration の条件でのみ認められ、low aeration では効果がなく、一方グルコースは適用範囲が広く、従つて low condition では寧ろ大豆油よりも効果的である。

今回は菌体増殖に、炭素源としてグルコースを澱粉で置換し得るか否か、更に大豆油とグルコースフィーディングの比較、大豆油以外の数種の植物油、脂肪酸の効果に就いて試験したので結果を報告する。

実 験 の 部

1. Starch-CSL 培地に於ける大豆油並にグルコースフィーディングの比較

実 験 方 法

- (i) 菌株 *Pen. chrysogenum* Q-176 pigmentless saltant を親株とする 1 変異株 H-512.
- (ii) 醗酵槽 5 l-Jar fermenter⁽²⁾.
- (iii) 培地 グルコースを澱粉 2.5% で置換する以外は既報⁽³⁾⁽⁴⁾の通りである。
- (iv) 培養条件 通気量は等量 (3 l/min.), 910 r. p. m., 24° で培養し、フェニール醋酸の添加、培養中の殺菌水の補給、pH 調節等は凡て既報⁽³⁾⁽⁴⁾の方法に準ずる。
- (v) 大豆油、グルコースのフィーディング 26 時間目より大豆油は毎時 0.5 cc (0.017%/hr.), グルコースは 30% 溶液を毎時 3 cc (0.03%/hr.) 添加する。但し初期 foaming の激しい時は消泡剤として大豆油を適時添加する。
- (vi) 分析 既報⁽¹⁾の方法に従う。

実 験 結 果 グルコースを澱粉に置換しても、大豆油、グルコースのフィーディングでペニシリンの生成が継続され、而も大豆油がグルコースよりすぐれていることがわかる (第 4 報参照)。

培養状態は澱粉の置換で培地はやや粘稠となり、40 時間の分析結果で澱粉は既に完全に利用されている。30 時間で pH 7.0 に達し、大豆油フィーディングの場合は、40 時間迄に消泡剤として 39 cc の大豆油を添加し、フィーディング時に僅かにアンモニア態窒素をみる。グルコースフィーディングの場合は 38 cc 添加し、醗酵終了時まで更に 9 cc 大豆油を添加する。この場合は培養中にアンモニア態窒素をみない。pH 調節には 10% H₂SO₄ をそれぞれ 110, 90 cc 使用するが 90 時間以降はほとんど調節の必要を認めなかつた。