

## 醤油麹中の細菌の生産する抗黴性物質 (第2報)

# 抗黴性物質生産菌の分離と同物質の調製

中 浜 敏 雄・万 雄 治

TOSHIO NAKAHAMA, YUJI MAN: On the antifungal substances produced by bacteria which grow in soja-koji usually. (Part 2). The isolation of one of the bacteria producing antifungal substance and the separation of it from the culture solution.

**摘 要** 醤油麹中に生育する数種の糸状菌の発育を抑制する作用を示す細菌を前報<sup>1)</sup>に引続き醤油麹より分離し、先づ15株の細菌を分離し、更にその中から抗黴力の顕著なる1株を選択した。而してこの細菌は醤油麹中に屢々存在する事及び前報<sup>1)</sup>の *Bac. AR* とは別種のものである事を確認した。その細菌を BC 菌と附号したが、形態的生理的特徴を検索の結果 BERGEY<sup>2)</sup> の分類による *Bacillus cereus* に類似するが、2, 3 の点で同一株と認め難い処もあり我々はその一変種と認定した。

BC 菌の生産する抗黴性物質は *Absidia*, 及び *Aspergillus niger* の生育を著しく抑制し、これについて *Mucor* に対しても顕著であるが、*Rhizopus* に対

しては比較的弱く、又 *Bac. AR* と異り *Aspergillus oryzae* に対しても明確な抗黴性を示した。但しその汙液より抽出精製して得た粉末物質は、DHA, vitamin K<sub>3</sub> 等と比較した場合更に強力であるが、*Aspergillus oryzae* に対しては、これらの既知抗黴性物質よりも選択的に劣勢であった。

BC 菌の生産する抗黴性物質はその理化学的性質の検討の結果 Ninhydrin 反応陰性の Polypeptide の如く推察される。

本研究に当り、醗酵研究所佐藤喜吉先生及び緒方浩一博士より御援助を受け、数株の糸状菌の分譲を賜った。ここに厚く感謝の意を表する。

通常醤油麹中に生育する *Absidia* に対して発育抑制作用を示す抗黴性物質生産細菌 *Bac. AR*<sup>1)</sup> を醤油麹より分離し、これについて既に報告したが<sup>1,2,3,4,5)</sup>、更に京都市内の醤油工場の麹中より類似作用を有する細菌を分離し、その抗黴性を比較し、又抗黴性物質生産条件の検討及び有効物質の分離抽出を行った。

### 実 験 の 部

#### (1) 細菌の分離と選択

京都市所在の醤油工場2工場に於て製麹された麹より前報の如くして *Absidia* に対する抗黴性を示す細菌15株を数回にわたり分離し、静菌力測定法によりそれらの抗黴性の強さを比較した。

##### (a) 分離細菌の抗黴性

15株の分離細菌を後に記述するA培地に30°, 7日間培養し、夫々の培養汙液について抗黴性を測定した。但し抗黴力の表示は前報<sup>1)</sup>に従ったもので、糸状菌培地1cc に対しその生育阻止に必要な各細菌の

培養殺菌汙液の最低量の逆数を以て表示した。

培養汙液の抗黴性は一般に *Absidia* 及び *Mucor* に対して強く *Rhizopus* 及び *Aspergillus oryzae* に対して弱い傾向のものが多く、この点表に比較する如く前報<sup>1)</sup>の *Bac. AR* と類似しているが、中には AF の如くその逆の傾向を有するもの、或いは AC, BD の如く何れの糸状菌に対しても抗黴性の劣っているものもあつた。而して BC は *Absidia* に対して *Bac. AR* と略同程度の抗黴力を示すが、*Aspergillus oryzae* に対しても又顕著な静菌作用を与える点が *Bac. AR* と異なる点である。しかも BC は *Bac. AR* と同様屢々麹中に於けるその生育を認めたのでここに特にこれを探り上げて研究を進める事にした。尚対照糸状菌は何れも麹中に屢々現われるもので麹中より分離して前報<sup>1)</sup>に於て使用したものと同一株である。

##### (b) 分離細菌の特徴

分離細菌の加糖ブイオン寒天培地上の聚落の状態、加糖ブイオンに於ける繁殖の状況及びその他の性質を

第1表 分離細菌の抗菌性

細菌	力 価				
	<i>Absidia sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Mucor sp.</i>	<i>Asp. niger</i>	<i>Asp. oryzae</i>
AA	10~14	<5	5~6	6~10	5~6
AB	10~14	<5	6~10	6~10	5~6
AC	<5	<5	6~10	<5	<5
AD	20~50	10~14	6~10	20~50	10~14
AE	20~50	<5	6~10	6~10	<5
AF	6~10	<5	10~14	20~50	10~14
AG	20~50	<5	20~50	20~50	20~50
BA	14~20	<5	10~14	14~20	<5
BB	10~14	5~6	6~10	10~14	5~6
BC	50~100	10~14	20~50	50~100	14~20
BD	5~6	<5	<5	<5	<5
BE	10~14	<5	10~14	14~20	<5
BF	20~50	6~10	6~10	20~50	6~10
BG	20~50	<5	20~50	14~20	20~50
ATO	50~100	<5	6~10	10~14	5~6
比較 Bac. AR	100	14	50	—	<4

比較した。

分離細菌15株は聚落の形、色沢、培養状態、細胞の形態等の観察の結果、僅かの差異を認めるものを一応別種のものとして取扱つたが第2表に於ける夫々の特徴及び第1表に於ける河液の抗菌性等より考察して必ずしも全部が別種とは考えられず、少く共非常に近接した変株が含まれている。その中抗菌力の一般に強力なるBCは前報の *Bac. AR* と比較して先づ聚落の色に於いて異り、その他明確に同一株と認め得ない

根拠を得た。

(2) 細菌の分類学的特徴

加糖ブイオンに増殖せる栄養細胞は短桿状(1.0~1.2×4.0~6.0μ) 両端鈍円、鞭毛は細胞の一端に束生し、活潑に運動する。グラム染色は陽性、孢子嚢は桿状(1.2~1.5×5.0~7.0μ)、胞子は細胞の略中心に存在し楕円形(0.6~0.8×1.0~1.2μ)である。加糖ブイオン寒天上の聚落は、不整形、灰色、無光沢、ブイオン液体培地では有皺皮膜を形成し、培養の初期に僅

第2表 分離細菌の特徴

細菌	培養液			硫化水素	アンモニア	硝酸塩還元	アセトイン	カタラーゼ	ウレアーゼ	インドール
	色(膜)	混濁	皺							
AA	淡黄	—	+	—	+	+	—	+	—	—
AB	"	—	+	—	—	+	—	+	—	—
AC	白	+	+	—	—	+	+	+	—	—
AD	淡黄	—	+	—	—	+	—	+	—	—
AE	"	—	+	—	—	+	—	+	—	—
AF	白	—	+	—	—	+	—	+	—	—
AG	"	—	+	—	—	+	—	+	—	—
BA	"	+	+	—	—	±	—	+	—	—
BB	褐色	—	+	—	—	+	—	+	—	—
BC	白	+	+	—	—	+	—	+	—	—
BD	淡緑	—	+	—	—	+	—	+	—	—
BE	褐色	—	+	—	—	+	—	+	—	—
BF	白	+	+	—	—	+	—	+	—	—
BG	"	—	+	—	—	+	—	+	—	—
ATO	淡黄	+	+	—	—	+	—	+	—	—
比較 Bac. AR	白	—	+	—	—	+	—	+	—	—

かに混濁するが直ちに液は透明となる。肉汁ゼラチン穿刺培養では Stratiform に液化する。牛乳は凝固せずペプトン化し、リトマス乳清を徐々に青変する。馬鈴薯培地上の聚落は、白色皺曲状で色素を生産しない。色素褪色性がありメチレンブルーを褪色する。カタラーゼを有するが、オキシダーゼ、ウレアーゼは有しない。アセトインを生成し、硝酸塩還元性があり、澱粉を加水分解する。シュクローズ、グルコース、マンノーズ、ラフィノーズ、マンニトール、グリセリンより生酸するが、ラクトーズ、キシロース、アラビノーズ、ガラクトーズ、デキストリンよりは生酸しない。その他形態的及び生理的特徴より BERGEY<sup>(6)</sup> の分類に依る *Bacillus cereus* に類似する。マンニトールより生酸する点で異なるので、その一変株とみなす事が至当である。

(3) 抗微生物物質生産の条件と経過

(a) BC 菌の抗微生物性

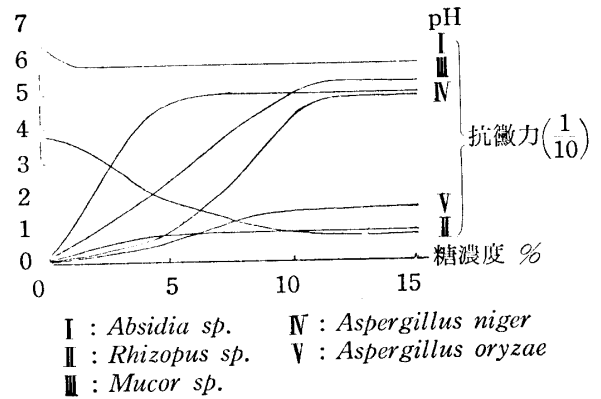
BC 菌を麵汁・肉汁培地に 30°, 7日間培養後その培養液について抗微生物試験を行った。表に示す BC 菌培養液量(cc)は対照糸状菌の培地 10cc 当りに添加した量を示すもので、力価は前報<sup>(7)</sup>の如く試験培地 1cc 当りの濃度の逆数である。

*Absidia sp.*, *Mucor sp.*, *Aspergillus niger* に対しては比較的強力な抗微生物性を示すが *Rhizopus sp.* に対する抗微生物性はやや劣る。*Aspergillus oryzae* に対する抗微生物性が顕著である点、前報の *Bac. AR* と異なる。

(b) 培養基組成の検討

BC 菌を用い、第 4 表に示す如き諸培地 (pH 7.0) に於て 30°, 7日間培養後、その培養液の抗微生物性を測定した。

硝炭又は硫炭を窒素源として用いた場合は細菌の繁殖が甚だ微弱であつたが、ペプトン、肉汁等にはより繁殖し、抗微生物物質の生産も顕著であつた。大豆抽出液、麴抽出液を含む培地も同様な結果が得られたが、特に麵汁、ペプトン、肉汁を含有する A 培地に旺盛に繁殖し、且最も多量に抗微生物物質を生産するものの如くであつた。



第 1 図 培養経過 (30°)

(c) 培養液の変化

BC 菌を A 培地に 30° に培養し、培養液の糖濃度、抗微生物性の変化及び pH を培養日数の経過と共に測定した。

第 1 図に示す如く糖は接種後暫時の後、急激に減少し、その後次第に緩慢となる。抗微生物性は糖の減少と共に増加する。pH は 5.8 附近に達した後は培養期間中殆んど変化が無かつた。

(4) 抗微生物物質の分離抽出

BC 菌を A 培地 6l に 30°, 10日間培養し、その培養液に Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> と CaCl<sub>2</sub> を夫々 1% 宛加え、よく攪拌し加温 (50~60°) 吸着後、分別して得た沈澱を 99% ethanol で 2~3 回抽出し溶媒を減圧下に溜去し、黄褐色の物質を得る。本物質を約 100cc の稀 NaOH に溶解し、N·HCl で pH 7 に調整し、不純物を除去後約 100cc の ether を添加する。この際 ether 層の下部に生ずる沈澱を取り、ether を減圧溜去後、水に溶解し、acetone を添加し (50%)、沈澱する不純物を除去する。脱 acetone 後 N·HCl で pH 2.5 とし、暫時放置後、沈澱を遠心分離し真空乾燥して淡黄色の粉末を得た (収量 650 mg)。尚磷酸カルシウムゲル吸着後の液、ether 添加後の水層及び ether 層には殆んど抗微生物性を認めなかつた。

(5) 分離物質の抗微生物性

分離した粉末 10mg を水に溶解して中和し 10cc と

第 3 表 BC 菌の抗微生物性 (+は対照糸状菌の繁殖を示す)

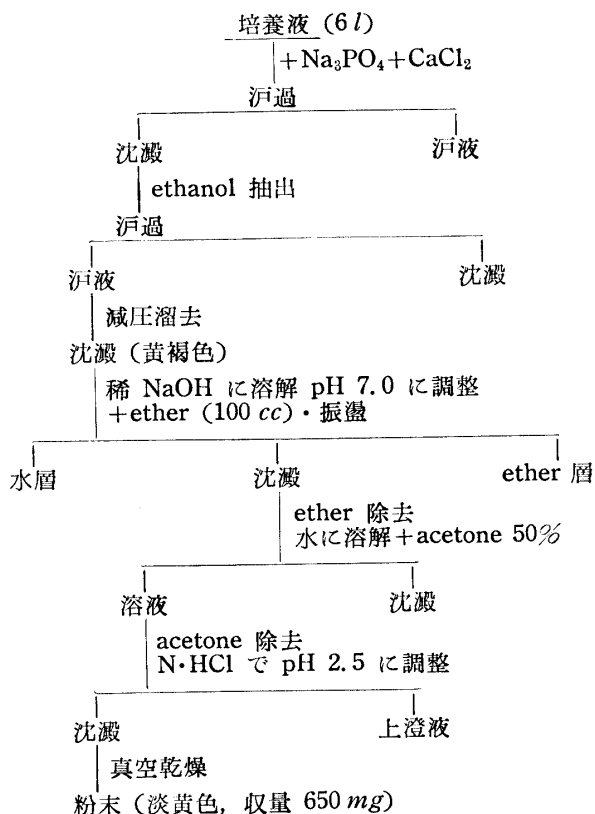
BC 菌培養液量(cc)	control	0.01	0.02	0.05	0.07	0.1	0.2	0.5	0.7	1.0	1.5	2.0	力価 (1/c)
糸状菌													
<i>Absidia sp.</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	50
<i>Rhizopus sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	10
<i>Mucor sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	20
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	50
<i>Aspergillus oryzae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	14

第4表 BC 菌に於ける培養基組成と抗微生物性 (30°)

培養基	組 成	糸 状 菌	力価( $\frac{1}{c}$ )	
A	ペプトン	0.5 g	<i>Absidia sp.</i>	50
	肉エキス	0.5 g	<i>Rhizopus sp.</i>	10
	食塩	0.05 g	<i>Mucor sp.</i>	20
	麵汁 (糖濃度 6%)	100.0 cc	<i>Aspergillus niger</i>	50
			<i>Aspergillus oryzae</i>	14
B	グルコース	5.0 g	<i>Absidia sp.</i>	<5
	ペプトン	1.0 g	<i>Rhizopus sp.</i>	5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g	<i>Mucor sp.</i>	<5
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 g	<i>Aspergillus niger</i>	<5
	水	100.0 cc	<i>Aspergillus oryzae</i>	<5
C	デキストリン	5.0 g	<i>Absidia sp.</i>	5
	ペプトン	1.0 g	<i>Rhizopus sp.</i>	5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g	<i>Mucor sp.</i>	<5
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 g	<i>Aspergillus niger</i>	<5
	水	100.0 cc	<i>Aspergillus oryzae</i>	6
D	シュクロース	5.0 g	<i>Absidia sp.</i>	<5
	ペプトン	1.0 g	<i>Rhizopus sp.</i>	<5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g	<i>Mucor sp.</i>	<5
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 g	<i>Aspergillus niger</i>	<5
	水	100.0 cc	<i>Aspergillus oryzae</i>	<5
E	グリセリン	5.0 g	<i>Absidia sp.</i>	5
	ペプトン	1.0 g	<i>Rhizopus sp.</i>	<5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g	<i>Mucor sp.</i>	<5
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 g	<i>Aspergillus niger</i>	20
	水	100.0 cc	<i>Aspergillus oryzae</i>	<5
F	グルコース	5.0 g	<i>Absidia sp.</i>	14
	ペプトン	0.2 g	<i>Rhizopus sp.</i>	10
	尿素	1.0 g	<i>Mucor sp.</i>	<5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g	<i>Aspergillus niger</i>	10
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 g	<i>Aspergillus oryzae</i>	10
G	グルコース	5.0 g	<i>Absidia sp.</i>	<5
	ペプトン	0.2 g	<i>Rhizopus sp.</i>	<5
	硫酸安	1.5 g	<i>Mucor sp.</i>	<5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g	<i>Aspergillus niger</i>	<5
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 g	<i>Aspergillus oryzae</i>	<5
H	グルコース	5.0 g	<i>Absidia sp.</i>	<5
	ペプトン	0.2 g	<i>Rhizopus sp.</i>	<5
	硝酸安	2.0 g	<i>Mucor sp.</i>	<5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g	<i>Aspergillus niger</i>	<5
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 g	<i>Aspergillus oryzae</i>	<5
I	ペプトン	1.0 g	<i>Absidia sp.</i>	6
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05 g	<i>Rhizopus sp.</i>	<5
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02 g	<i>Mucor sp.</i>	<5
	麵汁 (糖濃度 6%)	100.0 cc	<i>Aspergillus niger</i>	6
			<i>Aspergillus oryzae</i>	<5
J	ペプトン	1.0 g	<i>Absidia sp.</i>	20
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05 g	<i>Rhizopus sp.</i>	14
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02 g	<i>Mucor sp.</i>	14
	麦芽汁 (糖濃度 6%)	100.0 cc	<i>Aspergillus niger</i>	50
			<i>Aspergillus oryzae</i>	<5
K	ペプトン	0.8 g	<i>Absidia sp.</i>	20
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05 g	<i>Rhizopus sp.</i>	5
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02 g	<i>Mucor sp.</i>	10
	大豆抽出液	30.0 cc	<i>Aspergillus niger</i>	50
	水	70.0 cc	<i>Aspergillus oryzae</i>	<5
L	ペプトン	0.8 g	<i>Absidia sp.</i>	20
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05 g	<i>Rhizopus sp.</i>	14
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02 g	<i>Mucor sp.</i>	6
	麩抽出液	30.0 cc	<i>Aspergillus niger</i>	20
	水	70.0 cc	<i>Aspergillus oryzae</i>	20
M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05 g	<i>Absidia sp.</i>	20
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02 g	<i>Rhizopus sp.</i>	<5
	大豆抽出液	50.0 cc	<i>Mucor sp.</i>	5
	麵汁 (糖濃度 12%)	50.0 cc	<i>Aspergillus niger</i>	10
			<i>Aspergillus oryzae</i>	<5

第5表 分離粉末物質の抗微生物性

	control	0.05	0.07	0.1	0.2	0.5	0.7	1.0	1.5	2.0	発育阻止濃度
<i>Absidia sp.</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	1 : 100,000
<i>Rhizopus sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1 : 10,000
<i>Mucor sp.</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	1 : 14,000
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	1 : 50,000
<i>Aspergillus oryzae</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1 : 10,000



第2図 抗微生物物質の分離

しその抗微生物性を測定した。表に於ける発育阻止濃度は対照糸状菌の発育を完全に抑制する粉末物質の最低濃度を示すものである。

表に示す如く特に *Absidia sp.*, *Aspergillus niger* に対して顕著な抗微生物性を示す事を認めた。尚、前報<sup>1)</sup> *Bac. AR* の抗微生物物質(粉末)の力価と比較して BC 菌の場合は各糸状菌に対し夫々略10倍の抗微生物力に相当

するが、その数値が各対照糸状菌について平衡的であり、且つ両細菌の培養濾液の力価より考察して、両細菌の生産する抗微生物物質の抗微生物性の差と推察するよりも、むしろ取得した粉末の精製度の差によるものと推定すべきであろう。

(6) 既知合成抗微生物物質との比較

既知合成抗微生物物質と分離粉末の抗微生物性を第6表の如く比較した。

BC 菌の生産する抗微生物物質の粉末は、表に示す既知合成物質よりはるかに強力な抗微生物性を有する。しかし *Aspergillus oryzae* に対して選択的に劣勢である点は、これらの既知合成抗微生物物質との甚しき相異点である。

(7) 分離抗微生物物質の性質

(a) 耐熱性

分離粉末 100 mg を 50 cc に溶解し pH 7 とし、100° の沸騰水中に 5分、10分、及び 20分間浸漬後、その抗微生物性を測定した。

5分間煮沸に於て *Rhizopus sp.* に対する抗微生物性がやや減少するが、他の糸状菌に対しては安定である。10分間煮沸によつて多少抗微生物性の減少が見られるが、20分間煮沸によつても、10分間煮沸のもの以上の減少は見られず、熱に対して可成り安定である。但し糸状菌に対し加熱による抗微生物力の変化が必ずしも平衡的で無い事実は精製して得た粉末資料が只一種の抗微生物物質のみであると云う考えに対しては疑問を与えるものであり、今後の追求を必要とする。

(b) 分離粉末の理化学的性状

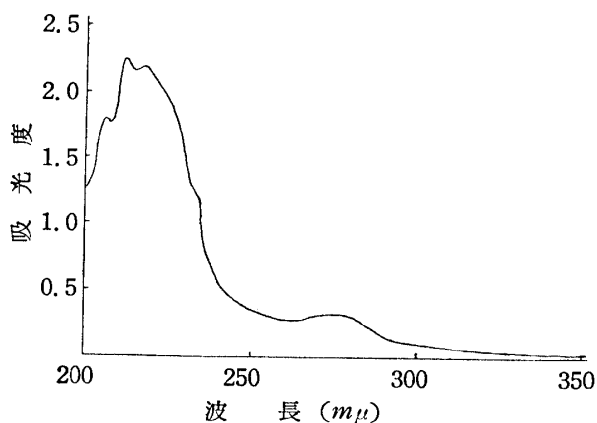
本物質は淡黄色の粉末であり、ペーパークロマトグ

第6表 既知合成抗微生物物質との抗微生物性の比較

糸状菌	発育阻止濃度			
	デハイドロ酢酸ソーダ (DHA)	Vitamin K <sub>3</sub>	プロピオン酸ソーダ	BC 菌分離粉末
<i>Absidia sp.</i>	1 : 2,000	1 : 20,000	1 : 1,428	1 : 100,000
<i>Rhizopus sp.</i>	1 : 5,000	1 : 4,000	1 : 667	1 : 10,000
<i>Mucor sp.</i>	1 : 5,000	1 : 4,000	1 : 5,000	1 : 14,000
<i>Aspergillus oryzae</i>	1 : 2,000	1 : 20,000	1 : 1,428	1 : 10,000

第 7 表 耐 熱 性

糸 状 菌	発 育 阻 止 濃 度			
	control 無処理	5 分 間 煮 沸	10 分 間 煮 沸	20 分 間 煮 沸
<i>Absidia</i> sp.	1 : 714,300	1 : 714,300	1 : 250,000	1 : 250,000
<i>Rhizopus</i> sp.	1 : 50,000	1 : 25,000	1 : >25,000	1 : >25,000
<i>Mucor</i> sp.	1 : 100,000	1 : 100,000	1 : 65,000	1 : 65,000
<i>Aspergillus niger</i>	1 : 250,000	1 : 250,000	1 : 250,000	1 : 250,000
<i>Aspergillus oryzae</i>	1 : 100,000	1 : 100,000	1 : 65,000	1 : 65,000



第 3 図 抗 黴 性 物 質 の 吸 収 ス ペ ク ト ル

ラフ (Buthanol・醋酸・水, 4 : 1 : 1) にて, 有効物質は Rf, 0.72~0.90 に存在し Ninhydrin で発色しない。Ninhydrin 反応陽性物質の混在が Rf 0.1 及び 0.2 に認められるが, その位置には抗黴性は認められない。Biuret 反応, Xanthoprotein 反応は陽性, Adamkiewitz 反応, Fehling 還元性, FeCl<sub>3</sub> 反応, 沃度カリ反応は陰性である。

光電光度計による比濁法で等電点 pH 2.5~3.5 が与えられるが, 抗黴活性の沈澱は pH 2.5 で最大である。methanol, ethanol 及び buthanol には可成り溶

解するが, acetone には難溶, ether 及び醋酸ブチルには不溶である。水には難溶であるが, 中和的に溶解し, 稀アルカリによく溶解する。

(c) 分離物質の紫外線吸収スペクトル

分離粉末 2mg を 10cc の水に中和的に溶解し, ベックマン Du 型分光光電比色計にて紫外部の吸収スペクトルを測定した。

図に示す如く 212 mμ 及び 275 mμ に吸収を示した。

引 用 文 献

- 1) 中浜敏雄・万 雄治 (1959) : 京都府大学報・農, **11**, 156~163.
- 2) E. A. JOHNSON, K. L. BURDON (1946) : J. Bact, **51**, 591.
- 3) M. LANDY et al. (1948) : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **67**, 539.
- 4) M. D. MICHENER (1948) : Arch. Biochem., **22**, 208.
- 5) 照井堯造・芝崎 勲 (1953) : 醗酵工学, **31**, 339.
- 6) BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology VII (1957)

Summary

We confirmed that there were some strains of bacteria which repressed the growth of injurious molds to the product in soja-koji.

We isolated fifteen strains of such bacteria from soja-koji and then selected one from them, which produced remarkably antifungal substance.

We studied on various properties of the bacterium and determined that it was variety of *Bacillus cereus*.

We attempted to separate and purify the antifungal substance from the culture solution of the

bacterium, and could get the powder as result which was nearly purified but yet containing very small amount of light yellow impurity.

Antifungal activity of this powder for various molds was stronger than each of vitamin K<sub>3</sub>, sodium dehydroacetate and sodium propionate except for *Aspergillus oryzae*.

We studied some physical and chemical characters of the powder and concluded that this antifungal substance was polypeptide of which ninhydrin reaction was negative.