

〈研究ノート〉

# DNA を用いたナチュラルチーズの菌叢解析に DNA 抽出方法が及ぼす影響

栗原 美帆, 榊田 和彌, 中西 員茂

Effects of DNA Extraction Methods on DNA Based Analysis of  
Bacterial Flora of Natural Cheese

Miho KURIHARA, Kazuya MASUDA, Kazushige NAKANISHI

## Abstract

〈Background & Methods〉 The flavor and smell of natural cheese are generated by various microorganisms involved in fermentation. Hence, microbiota should be elucidated to ensure the quality and safety of natural cheese. Various studies have been conducted on DNA extraction methods for bacterial flora analysis with DNA. Although DNA extraction methods have been investigated for natural cheese, the effects of extraction methods on bacterial flora analysis remain unclear. In the present study, four different methods were employed for DNA extraction from natural cheese to examine their effects on bacterial flora analysis by DGGE.

〈Results & Discussion〉 The DNA extraction methods differed in DNA yields and purity among the same samples and in the amplification efficiency of PCR. Bacterial flora analysis by DGGE showed different band patterns depending on the samples and extraction methods. However, the results of bacterial flora analysis were not correlated with the yields and purity of extracted DNA or amplification efficiency of PCR. Therefore, the effects on bacterial flora analysis could not be easily determined solely by the evaluation of extracted DNA. Thus, samples should be examined separately in bacterial flora analysis in consideration of differences due to DNA preparation, extraction methods, and PCR conditions.

## 1. 背景

近年日本では発酵食品の需要が増え、日本に古くから伝わる漬物や味噌などの発酵食品以外にもヨーグルトやナチュラルチーズといった海外発祥の発酵食品に対する関心が高まっている。発酵食

品とは微生物の生育を利用し、原材料にはない特徴的な風味の形成や保存性、機能性を高めた食品であり<sup>1)</sup>、その土地の気候風土や食文化に影響を受け様々な種類の発酵食品が誕生している。特に“乳”を使用した発酵食品は多くの地域で製造さ

れ、親しまれてきた。発酵乳製品において微生物の働きは大きく、微生物叢の豊かさは多彩な風味を生み出すことにつながる。その代表例がナチュラルチーズである<sup>2)</sup>。

ナチュラルチーズは、牛などの乳に乳酸菌やレンネットのような凝乳酵素を加え、熟成工程を経ることで製造されるものが多い。熟成には乳由来の細菌や添加されるカビが重要な役割を果たしている。これらは、乳に含まれる脂質やタンパク質を分解し、ナチュラルチーズがもつ独特の風味を形成する<sup>3)</sup>。また、一部のナチュラルチーズから検出される乳酸菌の中には類縁菌に対して抗菌活性を示すバクテリオシンを産生するものが確認されている。これはナチュラルチーズの製造時に増殖する可能性がある *Listeria monocytogenes* のような食中毒原因細菌の制御にかかわると考えられている<sup>4)</sup>。これらのことから、ナチュラルチーズ製造にかかわる微生物叢は、チーズの品質面及び安全面に大きな影響を与える要因となっていることが推察される。

ナチュラルチーズのような発酵食品をはじめ食品の微生物叢の解析は、培養法や DNA を標的とした分子生物学的手法により行われている。培養法では対象となる試料から単離培養を繰り返し、培養可能な細菌をひとつずつ同定することで菌叢を推測していた<sup>5)</sup>。しかし、培地で培養することが可能な微生物は限られているため、試料中の微生物叢を網羅的に解析することは困難であった。一方、次世代シーケンサーに代表される微生物の DNA を対象とした解析手法の場合、培養法では分離できなかった細菌も DNA レベルでは同定可能となり、迅速かつ簡便に、より正確な菌叢を把握できるようになった<sup>1, 5)</sup>。しかし、DNA の抽出や PCR による増幅の工程などで分子生物学的手法にも課題はある。分子生物学的手法では試料から抽出した DNA のうち、ターゲットとなる細菌がもつ DNA を PCR 法で特異的に増幅させ、そ

の DNA を解析していく。そのため DNA の抽出、PCR 法での増幅効率や精度がその後の菌叢解析に与える影響は大きいと考えられる。特に試料が食品の場合、DNA 増幅の阻害要素である脂質やタンパク質を多く含むため、いかに PCR 法の増幅に適した DNA を抽出することができるかが重要となる<sup>6)</sup>。

ナチュラルチーズの DNA 抽出方法は先行研究でも検討されており、抽出方法の差異により DNA の抽出量や精製度が異なることが報告されている<sup>6)</sup>。また、異なる抽出法により抽出された DNA を鋳型として、rDNA を対象とした PCR を行った場合、DNA の増幅効率が異なることが示されている<sup>6)</sup>。しかし、増幅された rDNA に含まれる細菌の種類は評価されておらず、DNA の抽出方法や PCR の条件がナチュラルチーズの細菌叢の解析に与える影響は明らかにされていない。菌叢解析においては DNA 収量や純度だけではなく、試料中に存在する多種多様な細菌を満遍なく検出できることが重要である。そのためには DNA レベルで試料中の細菌の種類を解析可能な変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE 法: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) など塩基配列の違いで分離・検出できる手法を用いて DNA 抽出方法を評価する必要がある。DGGE 法では試料から抽出した DNA を PCR により増幅する際に、GC クランプと呼ばれる GC 含量が高いプライマーを用いることで、増幅した DNA 末端片側の塩基配列は GC 含量が高い状態となる。この高 GC 含量の 2 本鎖 DNA を尿素やホルムアミドなどの変性剤を用いて濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行う。変性剤の濃度に応じて 2 本鎖 DNA の解離度が異なり、GC クランプ以外の配列部分が解離して Y 字型となるため DNA の移動に抵抗が生じる。そのため同じ長さの DNA であっても異なる塩基配列である場合、泳動距離に差が生じる。従って、PCR

により増幅した細菌叢に由来する DNA は DGGE 法を用いることにより、それぞれ異なるバンドパターンとして検出することが可能である<sup>7)</sup>。

本研究では3種類のナチュラルチーズを用いて DNA 抽出方法の違いが菌叢解析に与える影響を検討した。先行研究で評価されていた実績のある2手法、本研究室で実施していた糞便からの DNA 抽出方法及び市販試薬を用いた抽出方法の計4手法により DNA を抽出し、DNA 濃度及び純度を比較した。また、抽出したそれぞれの DNA を鋳型として PCR 法で増幅し DGGE 法により分離・検出した。

## 2. 材料及び方法

### ・供試試料

DNA の抽出は市販されているナチュラルチーズから、ゴルゴンゾーラ、ダナブルー、スティルトンの3種類を用いた。

### ・DNA 抽出方法

4種類の抽出方法により、それぞれのナチュラルチーズから DNA 抽出を行った。なお、DNA 抽出は各チーズから3検体採取した。検体はチーズ全体、または数十か所から採取しある程度のグラム数にした状態でよく混ぜ均一化したものを使用した。本実験で検討した DNA 抽出方法の概要を Table 1 にまとめた。

方法1は QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) (以下、Stool kit) を使用し、製品附属の説明書に従いそれぞれの試料 200 mg から DNA を抽出した<sup>6)</sup>。

方法2は、試料のナチュラルチーズをジルコニアビーズにより破碎後、DNA を抽出する方法である (以下、ビーズ破碎法)。Masuda ら<sup>8)</sup>の方法を参考に、滅菌した 0.1 mm 及び 0.3 mm ジルコニアビーズの入ったスクリュウキャップチューブに試料 200 mg をそれぞれ量り取った。チューブに試料溶解用緩衝液を添加後、生体組織破壊装置 TissueLyser II (QIAGEN) を使い Speed 25 の条件で 15 分間振盪し、組織破碎した。破碎した試料は、方法1と同じ製品を使用し DNA を抽出した。

方法3は市販されている細胞溶解用試薬を用いた抽出方法である (以下、細胞溶解法)。先行研究<sup>9)</sup>と製品説明書を参考に DNA を抽出した。ナチュラルチーズをそれぞれ 50 mg ずつマイクロチューブに採取し、細胞溶解液及び Proteinase K を添加した。反応は適宜攪拌しながら 56°C で 3 時間以上加温後、加熱により Proteinase K を失活させた。その後フェノール・クロロホルム法により夾雑タンパク質を除去し、エタノール沈殿により DNA を抽出した。

方法4は、Quigley ら<sup>6)</sup>の 'Lytic' method に従って行った。ナチュラルチーズ 1 g に生理食塩水

Table 1 本研究で用いた抽出方法

方法	抽出原理	概要
No. 1 QIAamp Fast DNA Stool Mini kit	固相抽出 カラム抽出	カオトロピック剤、プロテイナーゼ K などを用いて細胞を溶解し、シリカゲル膜のカラムを用いて抽出、精製
No. 2 ビーズ破碎法	固相抽出 ビーズ破碎 カラム抽出	カオトロピック剤、酵素、およびジルコニアビーズにより細胞を物理的に破碎後、No. 1 のシリカゲル膜のカラムを使用して精製。
No. 3 細胞溶解法	液液抽出	細胞溶解液、酵素により細胞を溶解後、フェノールによる除タンパク、エタノール沈殿をへて DNA を精製。
No. 4 Lytic Method	液液抽出 ビーズ破碎	カオトロピック剤、酵素、およびジルコニアビーズにより細胞を物理的に破碎後、No. 3 と同様にフェノール処理、エタノール沈殿による精製。

9 ml を加え 10% 乳剤とした。調製した 10% 乳剤 100  $\mu$ l にライソザイム, ムタノリシン, Triton X100 などの細胞壁分解酵素及び界面活性剤を加え, 37°C で 1 時間インキュベートした。さらに反応液に Proteinase K を加え 55°C で 1 時間インキュベートしタンパク質を分解した。加熱により Proteinase K を失活後, 反応液を 0.1 mm 及び 0.3 mm のガラスビーズが入ったチューブへ移し, TissueLyser II により試料を破碎した。破碎した試料は方法 3 と同様の工程でフェノール・クロロホルム処理, エタノール沈殿により, DNA を抽出した。

#### ・抽出した DNA の定量

それぞれの試料から抽出した DNA は超微量紫外可視分光光度計 (Thermo Fisher Scientific Inc 以下, NanoDrop 1000) を用いて, DNA 量, 純度 (A260/280 nm) を評価した。純度は A 260/280 nm の比を用いて評価した。260 nm の吸収波長は核酸由来であり, もう一方の 280 nm の吸収波長はタンパク質を想定している。そのため A260/280 nm の比はタンパク質の混入度合いを示し, 1.8~2.0 の場合試料の核酸純度が高いと考えられる<sup>10)</sup>。また, 核酸の吸収スペクトルを確認し, 次世代型超微量分光光度計 NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific Inc) の Thermo Scientific Acclaro™ (アクラロ) サンプルインテリジェンステクノロジー機能を用いて不純物特定を行った。

#### ・DGGE 法によるナチュラルチーズ細菌叢のバンドパターンの比較

ナチュラルチーズの総細菌叢を調べるため, それぞれの試料から抽出した DNA を 50 ng 鋳型とし, 16s rRNA 遺伝子 (16s rDNA) を PCR により増幅した。PCR プライマーは GC クランプの配列を追加した GC341F 及び 539R を用いた<sup>11, 12)</sup>。

DNA の増幅は TAKARA Ex Taq Polymerase (TAKARA) を使用し, PCR 反応液の調製は酵素付属の説明書に従った。PCR は MiniAmp Plus Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) で行い, 反応条件は 94°C, 1 分間の加熱後, 98°C, 10 秒間, 68°C, 1 分間を 1 サイクルとし, 計 35 サイクル反応後, 68°C で 5 分間の条件で行った。PCR 産物は 1  $\mu$ l を試料として 2% アガロースゲルで電気泳動により増幅の確認を行った。増幅が確認された試料は, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) を用いて精製し NanoDrop1000 で DNA 収量及び純度を測定した。DGGE 法は DCode System (Lonza Bioscience) により行った。ゲルは 8% ポリアクリルアミドゲルを使用し, 変性剤の濃度勾配は 20~65% とした。泳動する DNA 量は 1000 ng で統一した。電気泳動は 60°C で 40V, 15 分の予備泳動後, 60°C で 120V, 5 時間の泳動を行った。泳動後のゲルは SYBR Green (Lonza) により染色後, Gel Doc (Bio-Rad Laboratories) により各サンプルのバンドパターンを検出した<sup>6)</sup>。

### 3. 結果及び考察

#### ・各抽出方法での DNA 収量と純度の比較

DNA 抽出方法がナチュラルチーズの菌叢解析に及ぼす影響を DGGE 法により調べるため, 異なる手法により DNA を抽出した。各抽出方法での DNA 収量と純度は, NanoDrop 1000 を用いて測定し, 結果を Table 2 にまとめた。細胞溶解法による抽出と Lytic Method は高い DNA 収量を示したが, どちらも純度は約 1.3~1.4 (A260/280 nm) と低かった。いずれの方法も DNA 抽出の際にフェノールを用いている点が共通することから, フェノールの影響が考えられた。フェノールは 230nm~280nm に吸収波長を持っており, 測定試料に混入していた場合, DNA の純度を下げることが知られている<sup>10)</sup>。また, DNA もフェ

Table 2 各抽出方法での DNA 収量と純度

DNA抽出方法		試料	DNA収量 (ng/g) (平均値±SD)	DNA純度 (A260/280 nm)
No. 1	Stool Mini kit	ゴルゴンゾーラ	4745.45 ± 0.80 <sup>7</sup>	2.25
		ダナブルー	3883.33 ± 0.68 <sup>8</sup>	1.96
		スティルトン	3500.00 ± 1.42 <sup>9</sup>	1.95
No. 2	ビーズ破砕法	ゴルゴンゾーラ	1300.00 ± 0.33 <sup>12</sup>	2.55
		ダナブルー	2271.43 ± 0.44 <sup>11</sup>	2.05
		スティルトン	3147.37 ± 0.67 <sup>10</sup>	2.20
No. 3	細胞溶解法	ゴルゴンゾーラ	141000.00 ± 2.60 <sup>5</sup>	1.64
		ダナブルー	127500.00 ± 2.63 <sup>6</sup>	1.59
		スティルトン	541666.67 ± 43.22 <sup>1</sup>	1.64
No. 4	Lytic Method	ゴルゴンゾーラ	237777.78 ± 17.11 <sup>3</sup>	1.43
		ダナブルー	221800.00 ± 37.68 <sup>4</sup>	1.28
		スティルトン	496222.22 ± 44.55 <sup>2</sup>	1.36

試料の評価は n=3 で行った。DNA 収量の上付きの数字は収量の順位を表す。

ノールに近い吸収波長を持っているため、測定値が実際の DNA 収量より高値になった可能性が示唆された。

Stool Kit を用いた抽出は、先行研究<sup>6)</sup>と同等の収量を示し、純度も 2.0 (A280/280) 程度であったことから、抽出した方法の中では高い純度を示した。一方、ビーズ破砕法は Stool kit と DNA 精製工程で同じ製品を用いているにもかかわらず、DNA 収量が減少しており、試料に対するビーズ破砕の物理的な影響が示唆された。

#### ・ 16s rRNA 遺伝子 (16s rDNA) の増幅

異なる 4 手法で抽出した DNA は、純度に差が

認められたことから PCR により DNA の増幅が可能か確認を行った。抽出したそれぞれの DNA を鋳型とし、16s rRNA 遺伝子を PCR により増幅した。PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動を行い、DNA の増幅の有無を確認した (Fig. 1)。本実験で用いたプライマーセットにより増幅される 250bp 程度の分子量のバンドが、抽出したすべての DNA で検出された。Stool kit 及びビーズ破砕法により抽出した DNA を鋳型とした場合、試料間で PCR 産物の顕著な増幅の差は確認されなかった (Fig. 1-1, 1-2)。

また、細胞溶解液により抽出した DNA を鋳型とした場合、試料間で顕著な増幅の差は確認され



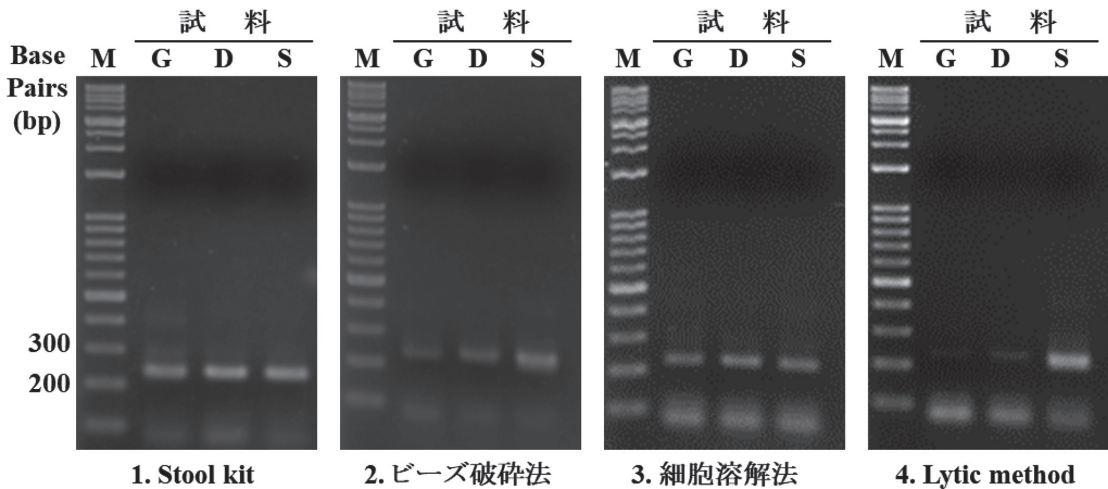


Fig.1 16s rRNA 遺伝子の増幅

抽出したそれぞれの DNA を鋳型とし、16s rRNA 遺伝子を PCR により増幅した。PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動を行い、DNA の増幅の有無を確認した。1 は Stool kit, 2 はビーズ破砕法, 3 は細胞溶解法, 4 は Lytic method の各抽出方法の泳動結果を表す。試料の G はゴルゴンゾーラ, D はダナブルー, S はスティルトンを泳動したレーンを示す。M は 1 KB DNA Ladder DM3200 (SMOBIO) を泳動したレーンを表す。

なかった (Fig. 1-3)。一方、細胞溶解法と同様に純度の低かった Lytic Method により抽出した DNA を鋳型にした場合、スティルトンは他の抽出方法と同様に増幅が確認され、ゴルゴンゾーラ及びダナブルーの増幅効率も低かった。(Fig. 1-4)。このことから、試料自体の PCR への影響が示唆された。あるいは PCR の鋳型 DNA を調製する際に DNA の希釈を行っていることから、DNA に含まれる夾雑物の PCR への影響が低下した可能性が考えられた。

#### ・ DGGE 法による総細菌叢のバンドパターンの観察

異なる手法によりナチュラルチーズから抽出された DNA は、増幅効率が異なることが示唆されたものの、すべて 16s rRNA 遺伝子の増幅が確認された。しかし、アガロースゲルによる電気泳動では、増幅された rRNA 遺伝子に含まれる細菌の多様性は判定できない。そのため同一の分子量であっても DNA の GC 含量により DNA の分離が可能な DGGE 法により、DNA 抽出方法の違い

が総細菌叢解析に与える影響を検討した。DGGE 解析の結果、ほとんどの試料で主要と考えられるバンドは DNA の抽出方法にかかわらず共通して検出された (Fig. 2)。ゴルゴンゾーラ、ダナブルーでは Stool Kit, ビーズ破砕法及び細胞溶解法により抽出した試料を増幅した DNA は、同様のバンドパターンを示した。Lytic Method では他の抽出方法に比べバンドの本数が少ない傾向がみられた。スティルトンでは、ビーズ破砕法、細胞溶解法、Lytic Method により抽出、増幅した DNA は類似したバンドパターンを示した。一方、Stool kit によりスティルトンから抽出、増幅した DNA では、他の手法で優勢菌種として検出されているバンド A, B, C, D が検出されなかった。

以上の結果より、DNA 抽出方法の違いが DGGE 法によるバンドパターン解析に影響を与えることが示唆された。本研究では DGGE 法により分離された各バンドの細菌種までは同定できていないことから、今後バンドの同定を進めることで、DNA 抽出方法が細菌叢解析に与える影響を具体的に検討することが可能になると考えられ

る。本実験で行った細菌叢解析では、DNA 収量と純度が高かった Stool Kit は、多くの試料で多様なバンドパターンを検出することができたものの、一部の試料では他の方法で抽出した DNA に比較しバンドパターンの減少が確認された。そのため DNA を用いて細菌叢解析を行う場合、試料から抽出した DNA の収量や純度の高さだけでは、網羅的な細菌叢解析に使用可能か判断するこ

とは困難であることが示唆された。一方、試料をビーズ破砕する抽出法では、DNA 収量と純度は他の手法より低かったものの、すべての試料で多様なバンドパターンを検出することができた。そのため試料をビーズにより破砕することは、ナチュラルチーズの細菌叢を解析するにあたり、DNA 抽出法として有効な手法だと考えられた。しかし、ビーズにより物理的に試料を破砕するこ

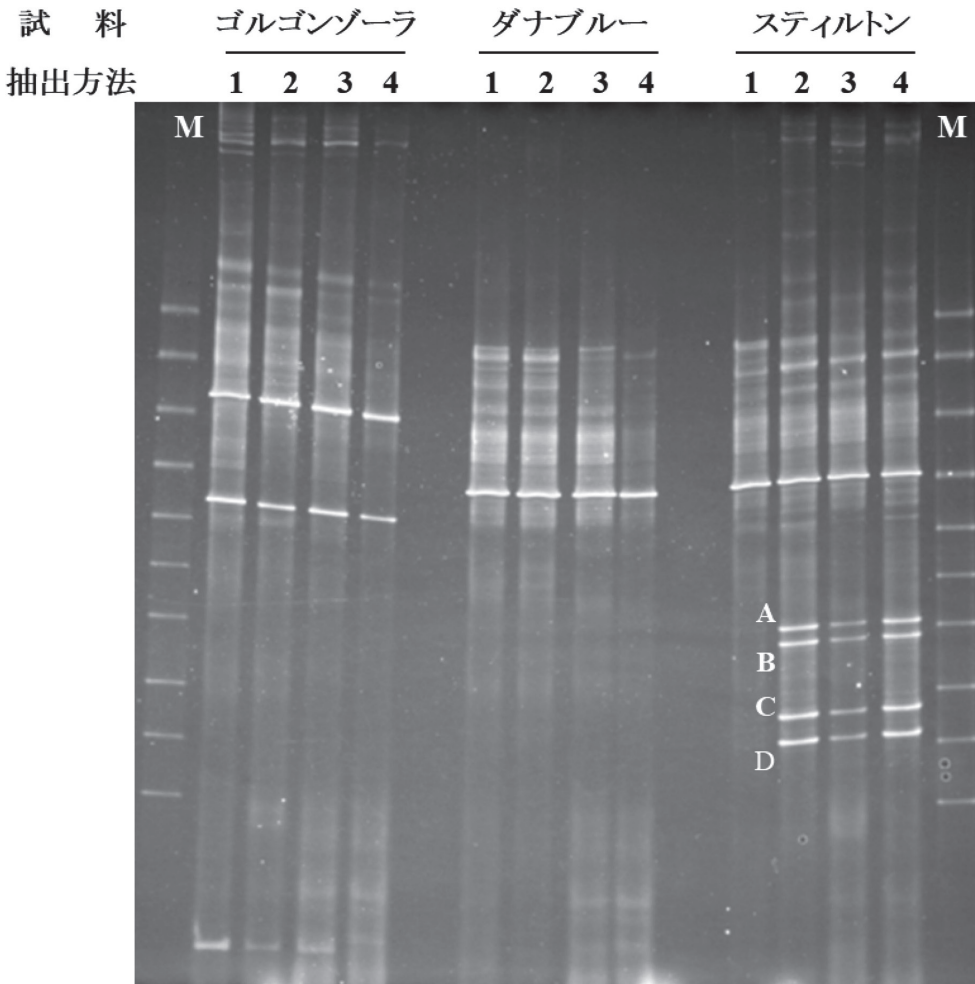


Fig. 2 DGGE 法を用いたナチュラルチーズの総細菌叢のバンドパターン

試料のナチュラルチーズから異なる手法で抽出した DNA を、特異的プライマーにより増幅し、DGGE 法により検出した。泳動に使用した DNA 量は 1000 ng とした。アクリルアミドゲルの変性剤濃度勾配は 20~65% とした。電気泳動は 60℃ で 40 V、15 分の予備泳動後、60℃ で 120 V、5 時間の泳動を行った。

抽出方法 No.1~4 はそれぞれ、1. stool kit、2. ビーズ破砕法、3. 細胞溶解法、4. Lytic method で抽出した試料から PCR により増幅した DNA を泳動したレーンを表す。白枠は試料間でバンドパターンに変化が確認された部分である。M は DGGE Marker (ニッポンジーン) を泳動したレーンを示す。

とで夾雑物の割合も増加する可能性がある。そのため、ナチュラルチーズに適した夾雑物の除去法を検討することは、細菌叢解析のDNAを調製するうえで重要であると考えられる。また、現在のDNAによる細菌叢の解析はPCRが必要になることから、抽出DNAに含まれる夾雑物のPCRの増幅効率への影響も重要である。先行研究<sup>13)</sup>において、乳に含まれるタンパク質分解酵素がDNAポリメラーゼを分解しPCRを阻害することが示唆されている。また、乳に含まれるカルシウムイオンはDNAポリメラーゼに対して他のイオンよりも高い阻害効果を示し、ナチュラルチーズに含まれるNaClもPCRにおけるDNAポリメラーゼの性能に影響を与えることが報告されている<sup>14)</sup>。これらのPCRの阻害要因の影響を低減することは、食品の微生物叢をより正確に反映した解析結果を得ることにつながることを期待される。

ナチュラルチーズをはじめとした発酵食品は、その製造工程に多様な微生物がかかわり、豊かな風味などを生み出している。一方で、発酵食品が食中毒の原因になることもあり、微生物叢の解析は、製品の品質や安全性の面で重要である。本研究の実施条件では、解析する試料やDNAの抽出方法の組合せにより異なる細菌叢解析の結果が得られた。そのため網羅的な細菌叢解析の前に試料に適したDNA抽出方法及び増幅条件の検討をすることで、より精度の高い細菌叢の解析が可能になるものと考えられた。本研究ではナチュラルチーズからのDNA抽出方法を中心に検討を行ったが、DNA抽出方法だけでなくPCRの増幅条件も検討することは、より正確なナチュラルチーズを含む乳製品や発酵食品の菌叢解析、ひいては食品のより良い菌叢解析手法の発見にもつながると考える。

## 引用文献

- 1) 小野浩, 中山二郎: 次世代シーケンサーを用いた発酵食品の菌叢解析., 日本乳酸菌学会誌, **25** 卷 (1), 3-12 (2014).
- 2) Sister Noëlla Marcellino O. S. B., David R. Benson.: The Good, the Bad, and the Ugly: Tales of Mold-Ripened Cheese., *Microbiology Spectrum*, **1** (No. 1) (2013).
- 3) B. Tiloccaa, N. Costanza, V. M. Morittua, A. A. Spinaa, A. Soggiub, D. Brittia, P. Roncadaa, C. Pirasc.: Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese Production., *Journal of Proteomics*, **210** (2020).
- 4) F. Irlinger and J. Mounier.: Microbial interactions in cheese: Implications for cheese quality and safety., *Current Opinion in Biotechnology*, **20**(2), 142-148 (2009).
- 5) 小柳喬, 伝統発酵食品中に築かれる細菌叢の変遷と多様性., 日本乳酸菌学会誌, **28** 卷 (2), 84-93 (2017).
- 6) L. Quigley, O. O'Sullivan, T. P. Beresford, R. Paul. Ross, G. F. Fitzgerald, P. D. Cotter: A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese., *Journal of Applied Microbiology*., **113**(1), 96~105 (2012)
- 7) 石井浩介, 中川達功, 福井学: 微生物生態学への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の応用., *Microbes and Environments*, **15**(1), 59-73 (2000).
- 8) 榊田和彌, 青木萌, 寺澤沙希, 飯野久和: Evaluation of the Efficacy of Fecal Sample Storage Methods for Analyzing Human Microbiota, 学苑・生活科学紀要 (昭和女子大学), **938**, 26-31 (2018).
- 9) 井伊悠介, 小岩智宏, 足立静香: 水産物からの簡易DNA抽出の検討, 農林水産省安全技術センター食品関係等調査研究報告, **40**, 33-41 (2017).
- 10) 柴山祥枝, 核酸 (DNA・RNA) の定量法——吸光分析法と蛍光分析法を中心に——, 機関誌「ぶんせき」, **7**, (2018).
- 11) G. Muyzer, EC. de. Waal, AG. Uitterlinden.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.,



- Applied and Environmental Microbiology*, **59**(3), 695-700 (1993).
- 12) Turner. SJ, Lewis. GD, Saul. DJ, Baker. CS, Rodrigo. AG.; Heteroduplex analysis: a simple method for characterizing microbial community structure., Poster paper presented at the New Zealand Microbiological Society Annual Meeting., Masterton, New Zealand, (1998).
- 13) W Abu Al-Soud, P Rådström.: Capacity of nine thermostable DNA polymerases To mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples.: *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(10), 378-53 (1998).
- 14) N.Favre, W.Rudin.: Salt-dependent performance variation of DNA polymerases in co-amplification PCR, *BioTechniques*, **21**(1), 28-30 (1996)
- (くりはら みほ 生活科学研究専攻 1年)  
(ますだ かずや 管理栄養学科 専任講師)  
(なかにし かずしげ 生活機構研究科 教授)
- 受理年月日 2022年9月30日  
審査終了日 2022年11月24日