

옥돔과 옥두어 판별을 위한 PCR 검사법 개발과 검증

김나예슬¹ · 양지영² · 김중범^{1,*}

¹순천대학교 식품공학과, ²부경대학교 식품공학과

Development and validation of a PCR method to discriminate between *Branchiostegus japonicus* and *Branchiostegus albus*

Na-Ye-Seul Kim¹, Ji-Young Yang², and Jung-Beom Kim^{1,*}

¹Department of Food science and Technology, Suncheon National University

²Department of Food Science and Technology, Pukyong National University

Abstract We developed and validated species-specific primers for *Branchiostegus japonicus* and *Branchiostegus albus* to prevent the sale of *B. albus* as *B. japonicus*. Primers for *B. japonicus* and *B. albus* were designed against the cytochrome b gene. Multiplex PCR showed a 288 bp amplicon for *B. japonicus*, a 159 bp amplicon for *B. albus*, and a 502 bp amplicon for the internal control. The PCR product bands for *B. japonicus*, *B. albus*, and the internal control were present at 1 ng each. The specificity and sensitivity of the primers developed in this study were validated by testing 38 *B. japonicus* strains and 13 *B. albus* strains. Using this monitoring method, fake fish did not appear due to the agreement between the experimental results and the species. Therefore, the developed multiplex PCR method was suitable for differentiating *B. japonicus* and *B. albus*.

Keywords: *Branchiostegus japonicus*, *Branchiostegus albus*, PCR, validation, monitoring

서 론

가짜식품(economically motivated adulteration, EMA)은 원재료를 속이고, 비교적 저렴한 원재료를 사용하여 부당한 방법으로 경제적 이득을 취하기 위해 제조된 식품이다(Kim 등, 2014). 이중 혼합식품이나 가짜식품은 형태학적으로 유사하거나 가공처리 되어 시각, 미각 등의 관능적인 방법으로 판별하는데 한계를 가지고 있다. 따라서 가공 처리 후에도 판별이 가능한 객관적이고 신뢰성이 있는 과학적인 판별법이 필요하다(Kim 등, 2014). 원재료 판별법은 단백질 분석법이 있으며 대표적으로 등전점 전기영동법(Isoelectric focusing, IEF), 모세관 전기영동법(capillary electrophoresis, CE), 면역효소측정법 등이 있다(Civera, 2003; Moretti 등, 2003). 단백질 분석법은 열, 건조 등의 가공 처리 시 단백질 및 특이적항원의 변성에 의해 감수성이 떨어지고, 같은 종일 경우 단백질 발현이 유사하여 판별이 불가능한 문제점이 있다(Chung 등, 2017; Fabric 등, 2005; Folmer 등, 1994; Hebert 등, 2003; Kim 등, 2014; Michael 등, 2005). 이화학적 분석법을 바탕으로 하는 크로마토그래피에는 liquid chromatography, gas chromatography 등이 있으며 원재료에 포함된 특정 물질의 정성 및 정량이 가능하나 복잡한 실험 방법과 고가의 장비를 사용하는 단점이 있

다(Schellenberg 등, 2010). 최근 원재료 판별법은 유전자를 기초로 하는 유전자 분석법을 사용하며 가공식품의 분석에 유용하다(Axayacatl와 Juan, 2008). 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR)은 대표적인 유전자 분석법으로 특정 유전자 부위를 반복 합성하여 증폭된 유전자를 분석하는 방법이다. PCR은 높은 특이도와 민감도를 가지고, 단시간에 다수 시료를 분석할 수 있어(Hebert 등, 2003; Michael 등, 2005; Park 등, 2013) 단백질 분석법이나 크로마토그래피법에 비해 간편하게 실험 할 수 있다.

농어목(perciformes), 옥돔과(malacanthidae)에는 전 세계적으로 16종, 일본은 5종, 중국은 3종, 한국은 4종이 알려져 있다. 한국에 분포하는 4종은 옥돔(*Branchiostegus japonicus*), 황옥돔(*Branchiostegus auratus*), 옥두어(*Branchiostegus albus*), 등쪽점옥두어(*Branchiostegus argentatus*)이다(Jenuth 등, 1996; Kim와 Ryu, 1998; Kim 등, 2006). 옥돔은 10-300 m 수심의 펄에 구멍을 뚫거나, 갈라진 틈새가 있는 환경에 서식하고 동중국해, 남중국해, 인도양 등 광범위하게 분포한다(Chung 등, 2017; Kim와 Ryu, 1998). 옥돔은 제주도 해역에서 주로 어획하여 제주 특산품으로 알려져 있고 고가의 어류로 높은 선호도를 나타낸다(Choi 등, 2004; Kim 등, 2006; Park 등, 2013). 현재 남획, 환경오염 등에 의해 옥돔의 어획량이 감소하여(Choi 등, 2004) 가격이 상승함에 따라 형태학적으로 유사하고 가격이 옥돔의 절반이 되지 않는 중국산 옥두어가 옥돔으로 위변조 되어 유통, 판매되는 사례가 증가하고 있다(Chung 등, 2017). 옥두어는 한국, 일본, 동중국해, 남중국해, 베트남 등에 분포 되어 있는 옥돔속의 어류로 모래와 펄이 있는 수심 90 m 환경에서 서식한다(Kim와 Ryu, 1998). 옥돔과 옥두어의 형태학적 판별은 정확성이 낮고 가열, 건조 등의 가공 처리 후에 판별이 불가능한 사례가 빈번히 발생하고 있다

*Corresponding author: Jung-Beom Kim, Department of Food Science and Technology, SunChon National University, Suncheon, Jeonnam, 57933 Korea
Tel: +82-61-750-3259
Fax: +82-61-750-3208
E-mail: okjbkim@sunchon.ac.kr
Received March 4, 2019; revised April 9, 2019;
accepted April 12, 2019

(Chung 등, 2017). 현재까지 옥돔과 옥두어 판별을 위한 유전자 분석법은 real-time PCR을 이용한 판별법(Chung 등, 2017)이 보고되고 있다. Real-time PCR은 실시간 증폭효소 연쇄반응으로 높은 감도와 신속성을 가지고(Chung 등, 2017) 정성 및 정량이 가능한 장점이 있으나 PCR 분석법에 비해 고가의 시약과 장비가 필요하다. 현재 개발되어 있는 real-time PCR 판별법은 한 번의 실험에 옥돔과 옥두어 각각만을 검출 할 수 있기 때문에 multiplex PCR 실험법에 비해 두 배의 시약과 노동력이 필요하다. 또한 일반적으로 옥돔과 옥두어는 절단이나 마쇄 없이 원물 상태로 판매되기 때문에 정량분석이 필요하지 않아 실험기관에 보편화 되어 있는 PCR 장비를 이용한 옥돔과 옥두어 판별법 개발이 필요하다 하겠다.

따라서 본 연구에서는 형태학적으로 유사하여 가짜식품으로 판매, 유통 될 수 있는 옥돔과 옥두어의 종 특이 primer를 개발하고 개발된 판별법의 검증과 모니터링을 통해 위변조 된 옥돔의 유통을 사전에 예방하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용된 옥돔(*B. japonicus*), 옥두어(*B. albus*) 등 표준 시료는 부경대학교 식품공학과에서 제공 받아 사용하였고, 모니터링은 시중 유통 중인 총 51건의 어류를 구입하여 사용하였다.

Genomic DNA 추출

각 시료의 genomic DNA는 PowerPrep™ DNA Extraction from Food and Feed Kit (Kogenebiotech, Seoul, Korea)를 이용하여 제조사의 권장 방법에 따라 추출하였다. 추출한 genomic DNA의 농도는 PICO 200 UV/Vis Spectrophotometer (Picodrop, Hinxton, UK)를 이용하여 측정하였다.

종 특이 primer 설계

National center for biotechnology information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록되어 있는 옥돔과 옥두어 미토콘드리아 유전자 전체 염기서열 중 cytochrome b gene을 대상으로 옥돔과 옥두어 종 특이적 primer와 공통 유전자 primer를 설계하였다. 염기서열의 정렬은 clustal omega (EMBL, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>)를 이용하였다. primer는 product size 150~500 bp, GC percent 30-60%로 primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>) 프로그램을 이용하여 설계하였다.

Polymerase chain reaction (PCR) 반응

PCR 반응액은 각각 genomic DNA 5 µL (10 ng), primer 4 µL

(10 pmol), 멸균증류수(distilled water) 11 µL를 혼합하여 반응액의 총 용량이 20 µL가 되도록 하였다. PCR 반응은 AccuPower® PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하였고 AllInOneCycler™ Fast 96 well PCR system (Bioneer, Daejeon, Korea) 기기를 이용하여 실험하였다. PCR 반응조건은 initial denaturation을 95°C에서 5분 실시한 후, denaturation을 95°C에서 20초, annealing을 52°C에서 20초, extension을 72°C에서 30초로 25 cycle을 반복하고 마지막으로 extension을 72°C에서 5분간 실시하여 PCR을 종료하였다. 증폭산물 확인을 위하여 1.5% 아가로스 겔에 PCR product 3 µL를 로딩하고 110 V에서 30분간 전기영동을 하였다.

종 특이 primer의 특이도

종 특이 primer의 특이도는 옥돔, 옥두어 표준시료 각각 2건과 negative control (멸균증류수), 그 외에 어종 20건(참다랑어, 황다랑어, 눈다랑어, 돛새치, 녹새치, 황새치, 낙지, 오징어, 참조기, 멧태, 꽁치, 갈치, 송어, 삼치, 대구, 광어, 고등어, 부세, 가자미, 연어)을 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA 농도가 10 ng이 되도록 희석하여 multiplex PCR의 template DNA로 사용하였으며 3반복 실험하였다.

종 특이 primer의 민감도

종 특이 primer의 민감도는 옥돔과 옥두어 표준시료의 genomic DNA농도가 100, 10, 5, 1, 0.1 ng의 농도가 되도록 희석하였다. 희석된 DNA를 single PCR과 multiplex PCR의 template DNA로 하였으며 3반복 실험하였다.

모니터링

옥두어를 옥돔으로 유통, 판매 되는 현황을 파악하기 위하여 옥돔, 옥두어 시료 51건을 개발된 multiplex PCR로 실험하였다.

결과 및 고찰

종 특이 primer

옥돔과 옥두어 판별을 위한 종 특이 primer 개발은 NCBI에 등록되어 있는 cytochrome b 유전자 영역을 대상으로 하였다. cytochrome b 유전자는 cytochrome c, 16S rRNA 등과 함께 염기서열이 널리 알려져 있는 유전자영역이다(Irwin 등, 1991). cytochrome b 유전자는 모계유전양상을 나타내어 유전자 재조합이 잘 나타나지 않으나 생물의 에너지 대사과정에 필요한 중요한 효소로 대사과정에서 반복적인 변화가 발생하여 종에 따른 차이가 나타난다(Esposti 등, 1993; Kim 등, 2012). 종 특이 primer 및 공통 유전자 primer 설계를 위하여 clustal omega 프로그램을 이용하여 염기서열을 정리하고, primer3 프로그램으로 primer 설계를

Table 1. Primer sequence designed in this study

Species		Sequences	Product size	Target gene
<i>B. japonicus</i>	Forward	5'- AGG CTT CAT GGT CCT CCT TA -3'	288	<i>cytB</i> ¹⁾
	Reverse	5'- CAG AAT AAG AGC TGG GAG AAG -3'		
<i>B. albus</i>	Forward	5'- AGG CTT CAT AGT CCT TCT CAC C -3'	159	<i>cytB</i>
	Reverse	5'- GAA CGT AAG ATG GCA TAT GCA A -3'		
Internal control DNA	Forward	5'- CTA AAA ATT GCT AAC GAC GCA -3'	502	<i>cytB</i>
	Reverse	5'- ATC GAG TTA GGG TGG CGT TAT -3'		

Primer sequence designed in this study

¹⁾*cytB*: Cytochrome b

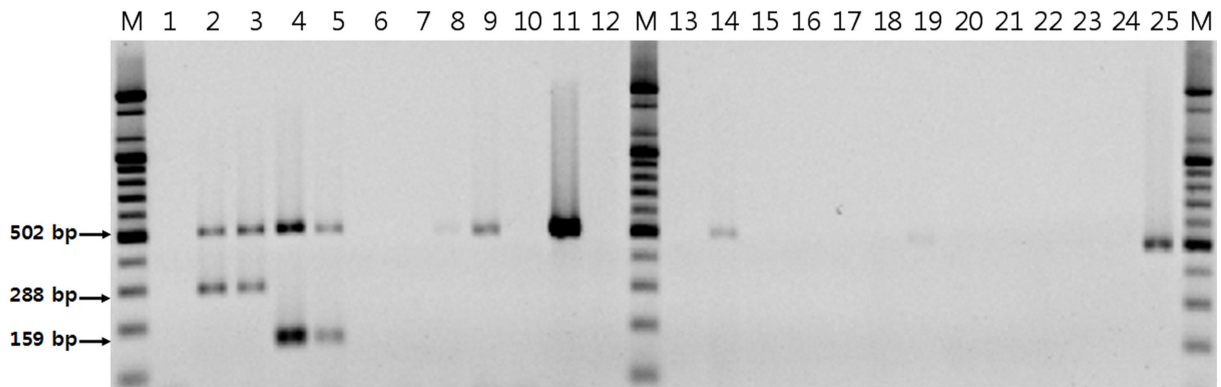


Fig. 1. Multiplex PCR specificity of *B. japonicus* and *B. albus*. Lane 1; negative control, Lane 2, 3; *B. japonicus*, Lane 4, 5; *B. albus*, Lane 6; *Thunnus thynnus*, Lane 7; *Thunnus albacares*, Lane 8; *Thunnus obesus*, Lane 9; *Histiophorus orientalis*, Lane 10; *Makaira mazara*, Lane 11; *Xiphias gladius*, Lane 12; *Octopus minor*, Lane 13; *Todarodes pacificus*, Lane 14; *Larimichthys polyactis*, Lane 15; *Theragra chalcogramma*, Lane 16; *Cololabis saira*, Lane 17; *Trichiurus lepturus*, Lane 18; *Mugil cephalus*, Lane 19; *Scomberomorus niphonius*, Lane 20; *Gadus microcephalus*, Lane 21; *Paralichthys olivaceus*, Lane 22; *Scomber japonicus* Houuttuyn, Lane 23; *Pseudosciaena crocea*, Lane 24; *Verasper moseri* Jordan et Gilbert, Lane 25; *Oncorhynchus keta*. M: size marker.

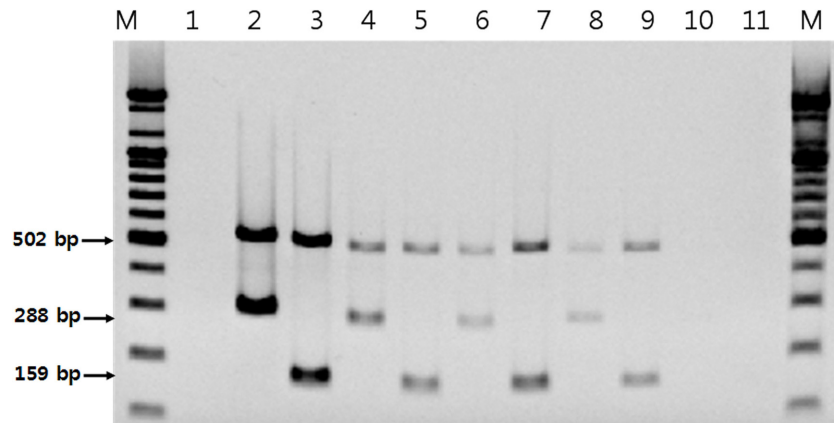


Fig. 2. Multiplex PCR sensitivity of *B. japonicus* and *B. albus*. Lane 1; negative control, Lane 2; *B. japonicus* 100 ng, Lane 3; *B. albus* 100 ng, Lane 4; *B. japonicus* 10 ng, Lane 5; *B. albus* 10 ng, Lane 6; *B. japonicus* 5 ng, Lane 7; *B. albus* 5 ng, Lane 8; *B. japonicus* 1 ng, Lane 9; *B. albus* 1 ng, Lane 10; *B. japonicus* 0.1 ng, Lane 11; *B. albus* 0.1 ng. M: size marker.

진행하였다(Table 1). primer3 프로그램의 조건은 product size 150-500 bp, GC percent 30-60%로 하였다. PCR 실험결과 옥돔 primer는 288 bp, 옥두어 primer는 159 bp, 공통 유전자 primer는 502 bp에서 증폭이 확인되었다.

옥돔과 옥두어 PCR 특이도

특이도란 “목적하는 대상만을 선택적으로 검출하는 능력 및 목적하지 않는 대상을 구별할 수 있는 능력”을 말한다(CAC, 2019; MFDS, 2019). Multiplex PCR 결과는 옥돔과 옥두어 중 특이적 primer가 각각 옥돔과 옥두어 template DNA만을 증폭하여 각각 primer의 목적에 적합한 중 특이적 증폭이 확인되었다. 공통 유전자 primer는 옥돔과 옥두어를 포함하여 눈다랑어, 돛새치, 녹새치, 참조기, 삼치, 연어의 template DNA만을 증폭하여 나머지 12종의 어류에 대한 DNA 증폭을 확인할 수 없었다. 그러나 본 연구의 목적인 옥돔과 옥두어에 대해 DNA 증폭을 나타내 PCR 반응 여부를 확인하기 위한 공통 유전자 primer로서 적합함을 확인하였다. Multiplex PCR 결과는 옥돔과 옥두어에 대한 중 특이적 증폭이 확인되었고, PCR 반응을 확인하기 위한 공통 유전자에 대한 증폭이 확인되었다(Fig. 1). 또한 옥돔을 288 bp, 옥두어

를 159 bp, 공통 유전자를 502 bp로 증폭되어 각각 PCR product 사이에 100 bp 이상 차이가 나타나 육안으로 정확하게 판별이 가능하였다(Noh 등, 2016).

옥돔과 옥두어 PCR 민감도

민감도란 “분석 대상물질의 농도 변화에 따른 측정값의 변화에 대한 비율”을 말한다(CAC, 2019; MFDS, 2019). 주형으로 사용된 옥돔과 옥두어 genomic DNA의 농도는 100, 10, 5, 1, 0.1 ng으로 희석하여 multiplex PCR의 template DNA로 사용하였다. Multiplex PCR 결과 옥돔 primer가 1 ng, 옥두어 primer가 1 ng, 공통 유전자 primer가 1 ng까지 밴드가 확인되었다(Fig. 2). 이러한 결과를 종합하여 가장 낮은 민감도인 1 ng을 multiplex PCR primer의 민감도로 판정하였으며 PCR 분석법에서 template DNA 농도를 100 ng 이하로 설정한다는 일반적 규칙을 만족하였다(Kim 등, 2014; Kim 등, 2015a; Kim 등, 2015b; Lee 등, 2004; Park 등, 2013; Song 등, 2008). 본 실험에서 개발된 multiplex PCR 방법은 특이도와 민감도가 확보되었으며 한 번의 실험으로 옥돔과 옥두어 모두를 검출 할 수 있어 비용과 노동력을 절감할 수 있었다.

Table 2. Monitoring results of *B. japonicus* and *B. albus* on the market

No.	Fish species	Experimental results	Decision
1	<i>B. albus</i>	<i>B. albus</i>	agreement
2	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
3	<i>B. albus</i>	<i>B. albus</i>	agreement
4	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
5	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
6	<i>B. albus</i>	<i>B. albus</i>	agreement
7	<i>B. albus</i>	<i>B. albus</i>	agreement
8	<i>B. albus</i>	<i>B. albus</i>	agreement
9	<i>B. albus</i>	<i>B. albus</i>	agreement
10	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
11	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
12	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
13	<i>B. albus</i>	<i>B. albus</i>	agreement
14	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
15	<i>B. albus</i>	<i>B. albus</i>	agreement
16	<i>B. albus</i>	<i>B. albus</i>	agreement
17	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
18	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
19	<i>B. albus</i>	<i>B. albus</i>	agreement
20	<i>B. albus</i>	<i>B. albus</i>	agreement
21	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
22	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
23	<i>B. albus</i>	<i>B. albus</i>	agreement
24	<i>B. albus</i>	<i>B. albus</i>	agreement
25	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
26	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
27	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
28	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
29	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
30	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
31	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
32	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
33	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
34	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
35	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
36	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
37	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
38	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
39	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
40	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
41	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
42	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
43	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
44	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
45	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
46	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
47	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
48	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
49	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
50	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement
51	<i>B. japonicus</i>	<i>B. japonicus</i>	agreement

모니터링

본 실험에서 개발된 multiplex PCR을 이용하여 시중에서 유통, 판매 되고 있는 옥돔과 옥두어 시료 51건을 모니터링 하였다 (Table 2). 실험결과는 옥돔 38건, 옥두어 13건으로 판정되어 시료의 어종과 실험결과가 100% 일치함을 확인하였고, 옥돔과 옥두어의 위변조 사례는 나타나지 않았다. 가공식품은 열, 건조 등의 처리에 의해 단백질 변성이 일어날 수 있어 최근 단백질에 비해 안정한 유전자를 분석하여 원재료를 판별한다(Aida 등, 2005). 옥돔은 생물의 형태뿐만 아니라 반건조, 구이 등의 형태로 유통, 판매 되고 있어 형태학적 판별에 어려움이 있고 단백질 변성이 일어날 수 있다. 모니터링을 통해 형태학적 및 단백질 분석법 보다 안정하며 높은 특이도와 민감도를 가지는(Hebert 등, 2003; Michael 등, 2005; Park 등, 2013) 유전자 분석법을 이용한 multiplex PCR 판별법이 유통, 판매되고 있는 옥돔과 옥두어의 판별에 적합함을 확인하였다.

요 약

본 연구에서는 형태학적으로 판별이 어려운 옥돔과 옥두어의 종 특이 primer를 개발, 검증한 후 모니터링을 통해 위변조 된 옥돔의 유통을 예방하고자 하였다. 옥돔과 옥두어 염기서열은 clustal omega 프로그램을 이용하여 정리하였고, primer3 프로그램을 이용하여 primer를 설계하였다. Multiplex PCR 결과는 옥돔과 옥두어에 대한 종 특이적 증폭이 확인되었고, PCR 반응을 확인하기 위한 공통 유전자에 대한 증폭이 확인되었다. 옥돔을 288 bp, 옥두어를 159 bp, 공통 유전자를 502 bp로 증폭되어 각각 PCR product 사이에 100 bp 이상 차이가 나타나 정확하게 판별이 가능하였다. Multiplex PCR 민감도 실험결과 옥돔 primer가 1 ng, 옥두어 primer가 1 ng, 공통 유전자 primer가 1 ng까지 밴드가 확인되었다. 모니터링 실험결과, 옥돔 38건, 옥두어 13건으로 판정되어 시료의 어종과 실험결과가 100% 일치함을 확인하였고, 위변조 사례는 나타나지 않았다. 본 실험에서 개발된 multiplex PCR 방법은 특이도와 민감도가 확보되었고 모니터링을 통해 유통, 판매되고 있는 옥돔과 옥두어의 판별에 적합함을 확인하였다.

감사의글

이 논문은 식품의약품안전처의 2017년도 연구개발사업지원비 (17162 미래사064)로 수행되었습니다.

References

- Aida AA, Che MYB, Wong CMVL, Raha AR, Son R. Analysis of raw meats and fats of pig using polymerase chain reaction for Halal authentication. *Meat Sci.* 69: 47-52 (2005)
- Axayacatl RO, Juan PCG. Molecular identification of dolphinfish species (genus *Coryphaena*) using multiplex haplotype-specific PCR of mitochondrial DNA. *Ichthyol. Res.* 55: 389-393 (2008)
- Choi JK, Kim HJ, Park CB, Lee CH, Song YB, Lee KJ, Yeo IK, Lee JU, Chang DS, Ha DS, Lee YD. Annual reproductive cycle and sexual characteristics of horsehead *Branchiostegus japonicus*. *Korean J. Ichthyol.* 16: 282-294 (2004)
- Chung IY, Seo YB, Yang JY, Kim GD. Development and validation of real-time PCR to determine *Branchiostegus japonicus* and *B. albus* species based on mitochondrial DNA. *J. Life Sci.* 27: 1331-1339 (2017)
- Civera T. Species identification and safety of fish products. *Vet. Res. Commun.* 27: 481-489 (2003)
- Codex alimentarius commission (CAC). Guidelines on performance

- criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods. Available from: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/>. Accessed January 11, 2019.
- Esposti MD, De Vries S, Crimi M, Ghelli A, Patarnello T, Meyer A. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1143: 243-271 (1993)
- Fabric T, Celia M, Catherine H. Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in Biotechnol.* 23: 359-366 (2005)
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3: 294-299 (1994)
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270: 313-321 (2003)
- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* 32: 128-144 (1991)
- Jenuth JP, Perterson AC, Fu K, Shoubridge EA. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nature Genet.* 14: 146-151 (1996)
- Kim JH, Byun MJ, Ko YG, Kim SW, Kim SW, Do YJ, Kim MJ, Yoon SH, Choi SB. Phylogenetic analysis of Korean native goats based on the mitochondrial cytochrome b gene. *J Animal Sci. Technol.* 54: 241-246 (2012)
- Kim JC, Kang IK, Kim DS, Lee JH. The fishery and fishing ground environment for red horsehead (*Branchiostegus japonicus*) on the adjacent seas of Jeju Island. *J. Kor. Soc. Fish. Tech.* 42: 19-29 (2006)
- Kim KH, Kim YS, Kim MR, Lee HY, Jung YK, Lee JH, Chang HS, Park YC, Kim SY, Choi JD, Jang YM. Development of species-specific primer to determine the authenticity of vegetable raw materials in food. *Food Eng. Prog.* 18: 419- 426 (2014)
- Kim KH, Kim YS, Kim MR, Lee HY, Lee KH, Kim JH, Seong RS, Kang TS, Lee JH, Jang YM. Development of primer sets for the detection of *Polygonum multiflorum*, *Cynanchum wilfordii* and *C. auriculatum*. *J. Fd Hyg. Safety* 30: 289-294 (2015a)
- Kim YU, Ryu JH. Taxonomic revision of the Genus *Branchiostegus*(Perciformes, Pisces) from the adjacent waters of Korea. *Korean J. Ichthyol.* 10: 40-48 (1998)
- Kim HS, Seo YB, Choi SS, Kim JH, Shin JY, Yang JY, Kim GD. Development and validation of multiplex polymerase chain reaction to determine squid species based on 16s rRNA gene. *J. Fd Hyg. Safety* 30: 43-50 (2015b)
- Lee HM, Ha JS, Jo YH, Nam SH, Yoon BS. PCR detection method of *Ascosphaera apis*, *Aspergillus flavus* for rapid identification of fungal disease in honeybee. *Korean J. Apiculture* 19: 139-148 (2004)
- Michael TM, Michael B, Gregory TR, Vogler AP. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Phil. Trans R. Soc. B.* 360: 1925-1933 (2005)
- Ministry of food and drug safety (MFDS). Guidelines on standard procedures for preparing test methods such as food. Available from: http://www.mfds.go.kr/brd/m_210/view.do?seq=12920. Accessed January 11, 2019.
- Moretti VM, Truchini GM, Bellagamba F, Caprino F. Traceability issues in fishery and aquaculture products. *Vet. Res. Commun.* 27: 497-505 (2003)
- Noh ES, Kang HS, An CM, Park JY, Kim EM, Kang JH. Rapid and specific identification of genus *Cynoglossus* by multiplex PCR assays using species-specific derived from the COI region. *J. Life Sci.* 26: 1007-1014 (2016)
- Park YC, Jung YH, Kim MR, Shin JH, Kim KH, Lee JH, Cho TY, Lee HJ, Lee SJ, Han SB. Development of detection method for *Niphon spinosus*, *Epinephelus bruneus*, and *Epinephelus septemfasciatus* using 16S rRNA gene. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 45: 1-7 (2013)
- Schellenberg A, Chmielus S, Schlicht C, Camin F, Perini M, Bontempo L, Heinrich K, Kelly SD, Rossmann A, Thomas F, Jamin E, Horacek M. Multielement stable isotope ratio (H, C, N, S) of honey from different european regions. *Food Chem.* 121: 770-777 (2010)
- Song JY, Lim JH, Nam MH, Kim HG, Kim BS. Development of PCR primers for specific identification and detection of *Botrytis cinerea* on tomato. *Korean J. Mycology.* 36: 138-143 (2008)