pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 27, No. 1, pp. 68~73 (2012)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

종 특이 프라이머를 이용한 식육가공품의 사용원료 판별법

박용춘* · 안치영 · 진상욱 · 임지영 · 김규헌 · 이재황 · 조태용 · 이화정 · 박건상[1] · 윤혜성
식품의약품안전청 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 식품감시과학팀
[1]광주지방식품의약품안전청 유해물질분석과

Identification of Raw Materials in Processed Meat Products by PCR Using Species-Specific Primer

Yong-Chjun Park*, Chi-Young Ahn, Sang-Ook Jin, Ji-Young, Lim, Kyu-Heon Kim, Jae-Hwang Lee, Tae-Yong Cho, Hwa-Jung Lee, Kun-Sang Park[1], and Hae-Sung Yoon
Scientific Food Investigation Team, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food & Drug Safety Evaluation, Food & Drug Administration, 643 Yeonje-ri, Gangoe-myeon, Cheongwon-gun, Chungcheongbuk-do 363-951, Korea
[1]Hazardous Substances Analysis Division, Gwangju Regional Korea Food & Drug Administration
(Received January 6, 2012/Revised February 3, 2012/Accepted March 5, 2012)

ABSTRACT - In this study, a method was developed using molecular biological technique to distinguish an authenticity of meats for processed meat products. The genes for distinction of species about meats targeted at 12S or 16S genes in mitochondrial DNA and the species-specific primers were designed by that PCR products' size was around 200bp for applying to processed products. The target materials were 10 species of livestock products and it checked whether expected PCR products were created or not by electrophoresis after PCR using species-specific primers. The results of PCR for beef, pork, goat meat, mutton, venison, and horse meat were 131, 138, 168, 144, 191, and 142 bp each. The expected PCR products were confirmed at 281, 186, 174, and 238 bp for chicken, duck, turkey-meat, and ostrich. Also, non-specific PCR products were not detected in similar species by species-specific primers. The method using primers developed in this study confirm to be applicable for composite seasoning including beefs and processed meat products including pork and chicken. Therefore, this method may apply to distinguish an authenticity of meats for various processed products.

Key words: EMA (Economically Motivated Adulteration), PCR (Polymerase Chain Reaction), processed meat product, species-specific primer

서 론

최근 값싼 식품원료를 사용하거나 표시사항을 허위로 기재하여 소비자를 기만하는 가짜식품의 제조유통으로 인하여 식품에 대한 막연한 불안감이 높아지고 있다. 가짜식품(EMA, Economically Motivated Adulteration)이란 경제적 이득을 취하기 위하여 제조된 식품을 일반적으로 말한다. 가짜식품은 우리의 건강을 위협할 뿐 아니라 건전한 식품 유통 질서를 어지럽히는 주범으로 우리나라에서도 외국처럼 이들 식품에 대한 관리, 감독을 강화해 나가야 할 시점이다. 미국 식품의약품청(FDA), 영국 식품기준청(FAS)에서도 최근에 늘어나는 가짜식품, 가짜 의약품, 가짜 화장품 등에 대한 관리를 강화하고 있으며, 유럽에서는 가짜원료가 혼입되어있는 식품으로부터 소비자를 보호하기 위하여 식품안전과 이력추적제도에 관련된 European Union regulation을 설정하였다. 주요사례로는 돼지고기에 소고기 향을 첨가 한 소고기 장조림, 메기내장을 사용한 창란젓, 무게를 늘리기 위하여 양파 또는 무를 혼합한 다진마늘, 틸라피아를 이용한 도미초밥, 설탕으로 먹이로 하여 제조되었으나 자연꿀로 표시, 옥수수기름을 혼합한 참기름 등이 대표적이다.

가짜식품의 경우 식품위생법 제 42조 품질관리 및 보고[1)]

*Correspondence to: Yong-Chjun Park, Scientific Food Investigation Team, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food & Drug Safety Evaluation, Food & Drug Administration, 643 Yeonje-ri, Gangoe-myeon, Cheongwon-gun, Chungcheongbuk-do, 363-951, Korea
Tel: 82-43-719-4454, Fax :82-43-719-4450
E-mail : yongchjun@korea.kr

에 의한 “품목제조보고관리대장”을 확인하는 서류검토 방법, 관능 및 육안 분석방법 등에 의하여 사용원료의 진위여부를 확인할 수 있으나 과학적인 시험법의 개발이 요구된다. 따라서 육안으로 원재료를 확인할 수 없거나 의도적으로 소량의 원료를 혼입하여 제조된 식품에 대하여 사용원료를 확인하는 방법에는 이화학적 분석법, 단백질분석법, 유전자를 대상으로 하는 분석법 등이 있다. 이화학적인 분석법으로는 광합성의 대사경로에 따른 탄소동위원소비율 분석법을 활용한 벌꿀의 진위판별[2,3], 분자량이 적은 ion-fragment의 패턴차이를 이용하여 비교분석하는 MS-전자코 분석법[4,5,6,7,8] 등이 있으며, 단백질분석법은 면역학적 방법[9,10]이 주로 이용되고 있다. 유전자는 모든 동물 및 식물의 조직 내에 존재하며 식품제조 공정 중 처리되는 압력, 고열 등에 대하여 단백질 보다 안정성이 높은 장점이 있다. 또한 PCR에 의하여 일부 유전자를 특이적으로 증폭시키는 방법은 신속성, 간편성, 민감도, 특이도 등이 우수하여 최근에는 식품원료 동정을 위하여 많은 연구가 진행되고 있다[11,12,13,14,15,16].

종 판별을 위한 유전자 증폭에는 크게 두 가지로 구분할 수 있다. 첫째 일반프라이머(universal primer)를 이용하여 증폭 후 염기서열을 결정하고 유전자은행(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi 등)에 등록되어있는 염기서열과 비교하여 종을 판별하는 방법[11,12,15,17], 두 번째 종 특이 프라이머(species specific primer)를 개발하여 유전자 증폭 유무로 종을 판별하는 방법[14,16]이 있다. 일반프라이머를 이용하는 경우에는 대부분 PCR 산물의 크기가 700bp 이상으로 되어 있어 가공식품에 적용하기에는 한계가있다. 즉, 가공식품에는 제조공정 중에 주형유전자가 파괴되어 PCR 산물의 크기를 최소화하여야 되기 때문에 종 특이 프라이머를 이용하는 방법을 개발하였다.

본 연구에서는 소고기 등 10종의 식육에 대한 진위판별을 위하여 종 특이 프라이머를 설계하여 식육원료에 대하여 일차적으로 적용하였으며 최종적으로 식육을 원료로 제조된 가공식품에 대하여 적용가능성을 확인하였으며 향후 과학적 식품감시에 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

가짜식품 유통사례 모니터링

국내・외 언론보도 등으로부터 가짜식품의 유통사례에 대한 정보를 입수하고 유전자분석법으로 진위판별이 가능한 목록을 작성하였다. 중국에서의 대표적인 사례로는 돼지고기에 소고기 향을 첨가한 소고기 장조림, 메기내장을 사용한 창란젓 등이 있으며, 국내에서는 다진마늘에 무게를 늘리기 위하여 양파 혼입, 홍삼분말에 마 혼입, 도미초밥에 틸라피아를 사용하는 경우 등이 있다.

시약 및 검체 구입

유전자증폭(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 위한 프라이머 및 *Taq* DNA polymerase는 바이오니아(Bioneer, 대한민국)에 의뢰하여 합성 또는 구매하였으며, PCR 장비는 GeneAmp™ PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA)을 사용하였다. 유전자추출을 위한 DNeasy Blood & Tissue kit는 Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)로부터 구매하였다. 검체로 사용된 소고기, 돼지고기, 닭고기, 오리고기는 대형마트에서 염소고기, 양고기, 말고기, 칠면조고기, 타조고기는 사육농장에 의뢰하여 가공되지 않은 상태의 축산물 형태로, 사슴은 녹각을 구매하여 사용하였다. 가공식품인 축산물가공품 및 복합조미식품 등은 일반마트에서 구매하였다.

유전자 추출

축산물 및 축산물가공품은 DNeasy Blood & Tissue kit를 사용하여 유전자를 추출하였으며 추출방법은 제조사에서 제공하는 방법에 따랐다. 단 최종 용출단계에서는 AE 완충용액 대신 멸균증류수를 사용하여 DNeasy Mini spin 칼럼으로부터 용출하였다

프라이머 설계

종 특이 프라이머를 설계하기 위하여 미국 생물유전자원은행(www.ncbi.nlm.nih.gov)에 등록되어있는 유전자 염기서열을 이용하였다. 즉, 소 등 10종에 대하여 미토콘드리아에 존재하는 12S 부터 16S ribosomal RNA의 염기서열을 대상으로 비교분석하였다. 사슴 및 칠면조는 12S 유전자부위를, 소 등 8종은 16S 유전자 부위를 대상으로 하였으며 가공식품에 적용하기 위하여 가능한 PCR 산물의 크기가 200bp 이내가 되도록 설계하였다(Table 1).

Polymerase Chain Reaction(PCR) 반응액의 조성 및 조건

PCR을 위한 반응 액의 조성은 주형 DNA 50 ng, dNTPs 200 μM, $MgCl_2$ 2.5 mM, 프라이머 각 0.5 μM이 되게 혼합하였으며 최종 부피는 25 μL로 하였다. 그리고 종별로 PCR 조건은 달리하여 실시하였다.

소고기, 돼지고기, 양고기, 염소고기, 사슴고기 및 말고기 검출을 위한 반응조건은 95°C에서 10분 예비가열 후, 95°C 30초 변성, 59°C 10초 재결합, 72°C 40초 중합반응의 과정을 40회 반복하고 마지막에 72°C에서 5분간 처리하였다(Table 2). 오리고기, 칠면조고기, 타조고기 검출을 위한 반응조건은 95°C에서 10분 예비가열 후, 95°C 30초 변성, 63°C 7초 재결합, 72°C 30초 중합반응의 과정을 40회 반복하고 마지막에 72°C에서 5분간 처리하였다. 닭고기 검출을 위한 반응조건은 95°C에서 10분 예비가열 후, 95°C 30초 변성, 62°C 5초 재결합, 72°C 30초 중합반응의 과정을 40회 반복하고 마지막에 72°C에서 5분간 처리하였다(Table 3).

Table 1. Information of primer for detection of livestock used in this study

Item	Name	Sequence(5'-3')	Amplicons size(bp)	Remarks
Cattle	SFI11-Cow-F	TATCTTGAACTAGACCTAGCCCAATG	131	16S
	SFI11-Cow-R	GGTACTTTCTCTATAGCGCCGTAC		
Pig	SFI11-Pig-F	CAACCTTGACTAGAGAGTAAAACC	138	16S
	SFI11-Pig-R	GGTATTGGGCTAGGAGTTTGTT		
Sheep	SFI11-Lam-F	GTACAACCTTCACTAGAGAGTAAGATC	144	16S
	SFI11-Lam-R	CCAGTATTAAATCTAGGAGTTGGCTAATG		
Goat	SFI11-Goa-F	CAACCTTCACTAGAGAGTAAGACTCT	168	16S
	SFI11-Goa-R	ATTGCTTCTATTTAATAATAGAGCG		
Deer	SFI11-Dee-F	TCAAGCACACATCCGTAGCTCA	191	12S
	SFI11-Dee-R	CTTTAACACACTTTACGCCGTATG		
Horse	SFI11-Hor-F	TACAACCTTCATTAGAGAGTAAGAACAAG	142	16S
	SFI11-Hor-R	CAGTATGAGATTAGGAGTTAGTT		
Chicken	SFI11-Chi-F	CCTAAAGACACCCACCTTTGT	281	16S
	SFI11-Chi-R	CCGTAGGAGGATAGGTTCCAGA		
Duck	SFI11-Duc-F	CCCAGAACCACAATGAGATGATTAAG	186	16S
	SFI11-Duc-R	GTAAGGGATTCATCTTGTTTTGGC		
Turkey	SFI11-Tur-F	TGCCCTAACCCCTTAAGAAAAGAA	174	12S
	SFI11-Tur-R	GGCACAAGATTTACCAACCCTAAAG		
Ostrich	SFI11-Ost-F	CCTCTAGCTCATCCACCCACTTG	238	16S
	SFI11-Ost-R	CGGGATGGCAAGCTTAAATTC		

Table 2. PCR conditions for detection of cow, pig, sheep, goat, deer and horse

Steps	Temp.	Time	cycles	Remarks
Initial denaturation	95°C	10min	1	
Denaturation	95°C	30sec		
Annealing	59°C	10sec	40	
Extension	72°C	40sec		
Elongation	72°C	5min	1	

Table 3. PCR conditions for detection of duck, turkey and ostrich

Steps	Temp.	Time	cycles	Remarks
Initial denaturation	95°C	10min	1	
Denaturation	95°C	30sec		
Annealing	63*°C	7*sec	40	
Extension	72°C	30sec		
Elongation	72°C	5min	1	

*annealing condition for detection of chicken : 5 sec at 62°C

결 과

종 특이 프라이머를 이용한 식육원료 동정

본 연구에서는 축산물을 이용한 가공식품 중 사용원료를 확인하기 위한 종 특이 프라이머를 개발하였다. 대상 유전자로는 미토콘드리아 유전자 중 12S 또는 16S DNA를 대상으로 하였다. 가공식품의 경우 제조공정 중 가열, 압력 등에 의하여 세포에 존재하는 유전자가 손상되어 PCR 방법을 적용하기위하여 PCR 산물의 크기는 가능한 200bp 이내로 프라이머를 설계하였다. 즉, 소, 돼지, 양, 염소, 말, 닭, 오리 및 타조는 16S DNA, 사슴 및 칠면조는 12S DNA 부위를 대상으로 설계하였으며 종별로 PCR 산물의 생성여부를 확인하였다.

그리고 유사종에 대한 비특이적 PCR 산물(nonspecific PCR product)의 생성여부를 확인하기 위하여 축산물 총 10종에 대하여 가축(소, 돼지, 양, 염소, 사슴, 말)과 가금류(닭, 오리, 칠면조, 타조)를 유사종 집단으로 구분하였다. PCR 결과 소, 돼지, 염소, 양, 사슴, 말에 대하여 각각 131, 138, 168, 144, 191, 142 bp의 PCR 산물이 생성되었으며 유사 종에 대하여는 교차반응에 대한 비 특이적 밴드는 나타나지 않았다(Fig. 1). 또한, 닭, 오리, 칠면조, 타조에 대하여 각각 281, 186, 174, 238bp의 PCR 산물이 생성되었으며 유사 종에 대한 비 특이적 밴드는 나타나지 않았다(Fig. 2).

축산물가공품에 대한 적용

본 연구에서 개발된 돼지고기 및 닭고기 검출용 프라이머를 이용하여 시중에 유통 중인 축산물가공품을 대상으로 적용성을 검토하였다. 대상 식품으로는 돼지고기만을 함유하는 제품 1건과 돼지고기 및 닭고기를 혼합하여 제조된 제품 4건을 대상으로 실시하였다. 그 결과 돼지고기만을 함유하는 제품(돼지고기 83%)은 돼지고기 종 특이 프라이머를 사용한 경우에만 PCR 산물이 생성되었으며, 돼지고기 및 닭고기를 혼합한 제품에 대하여는 돼지고기 및

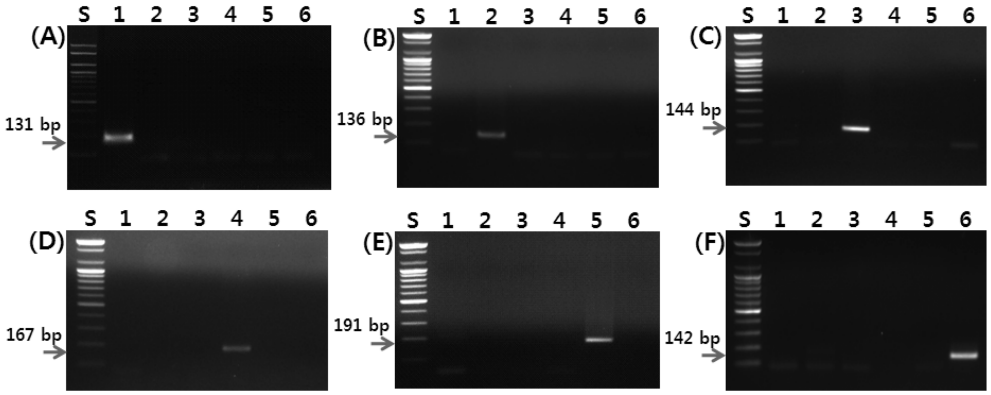

Fig. 1. Detection of livestock by PCR using species-specific primer [Cattle(A), Pig(B), Sheep(C), Goat(D), Deer(E) and Horse(F)]. Lane 1 ; Cattle, 2 ; Pig, 3 ; Sheep 4 ; Goat, 5 ; Deer, 6 ; Horse.

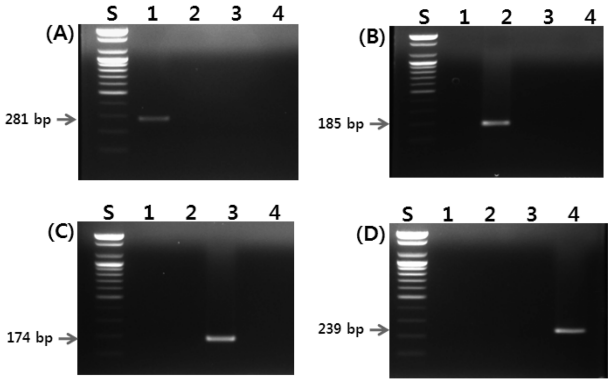

Fig. 2. Detection of poultry by PCR using species-specific primer [Chicken(A), Duck(B), Turkey(C) and Ostrich(D)]. Lane 1; chicken, 2 ; duck, 3 ; turkey, 4 ; ostrich.

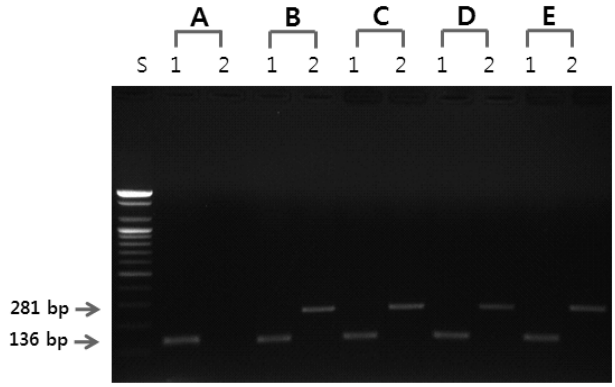

Fig. 3. Detection of pig and chicken from processed meat products by PCR using species-specific primer[pig(lane 1), chicken (lane 2)]. Sample A(only pig meat 83%), B(pig meat 18%, chicken meat 44%), C(pig meat 54%, chicken meat 27%), D(pig meat 45%, chicken meat 45%), E(pig meat 72%, chicken meat 10%).

닭고기 특이 프라이머를 이용한 PCR 산물이 모두 검출(돼지 18% 및 닭 44% 함유제품 1건, 돼지 54% 및 닭 27% 함유제품 1건, 돼지 45% 및 닭 45% 함유제품 1건, 돼지 72% 및 닭 10% 함유제품 1건)되었다(Fig. 3).

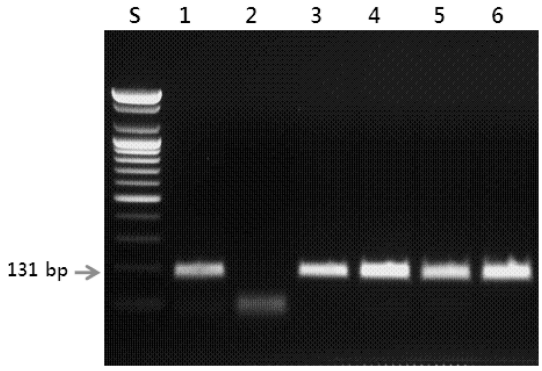

Fig. 4. Detection of cattle meat from composite seasonings by PCR using cattle-specific primer. Lane 1 : cattle meat, 2 : not contained cattle meat, 3 : cattle 11%, 4 : cattle 10%, 5 : cattle 5%. 6 : cattle 8%.

또한 소고기 검출용 프라이머의 경우 시중에 유통 중인 복합조미식품을 대상으로 확인하였다. 그 결과 소고기를 함유하는 제품(소고기 5% 함유제품 1건, 8% 함유제품 1건, 10% 함유제품 1건, 1% 함유제품 1건)에서 모두 소고기 종 특이 프라이머를 사용한 경우 PCR 산물이 생성되었다(Fig. 4). 따라서 본 연구에서 개발한 분석법은 가공식품에 대한 적용성을 최종 확인하였으며 향후 식품원료를 허위로 표시한 가짜식품을 판별하는 경우 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

고 찰

값싼 식품원료를 의도적으로 혼합하거나 표시사항을 허위로 기재한 EMA 식품의 제조·유통 사례가 급증함에 따라 미국 식품의약품안전청(www.fda.gov) 및 영국 식품기준청(www.food.gov.uk) 등에서는 EMA 방지를 위한 노력을 하고 있다. 이에 따라 가공식품에 사용된 식품원료를 확인하는 시험법의 개발이 요구되고 있다. 일반적인 농·축·수산물의 경우 육안으로 관찰하여 원재료를 확인할 수 있으나 가공식품의 경우 육안으로 사용된 원재료를 확인

하는 방법이 어려우며 의도적 혼입량이 소량일 경우에는 이화학적인 방법보다는 분자생물학적인 분석법의 접근이 용이하다.

유전자분석을 통한 생물체 동정법은 크게 두 가지로 나눌 수 있으며 첫번째 일반 프라이머를 이용하여 PCR을 실시하고 염기서열 결정 후 데이터베이스를 이용하여 상호 비교분석하는 방법이다. 이 경우 동물성 원료의 경우 2003년 Herbert 등은 미토콘드리아에 존재하는 유전자(cytochrome c oxidase subunit, cytochrome c 등)의 일부를 이용하면 신속하고 정확하게 할 수 있다고 제안하였으며 DNA barcoding이라는 용어를 처음으로 사용하였다[15]. 식물성원료의 경우는 ribulose bisphosphate carboxylase (rbcL), maturase (matK) 등이[10], 곰팡이류에는 internal transcribed space (ITS)가 주로 사용되고 있다. 특히 cytochrome c oxidase subunit 1 (CO1) 유전자는 해양무척추동물의 동정을 위하여 1994년 Folmer 등이 최초로 제안하였으나[12] 현재에는 대부분의 동물류에 사용하고 있는 실정이다. 장점으로는 종 특이 프라이머를 설계하지 않고 동정이 가능하여 손쉽게 이용할 수 있다. 단점으로는 PCR 후에 염기서열을 결정하는 단계가 추가되어 비교적 분석시간이 길고, 새로운 종 또는 희귀종의 경우에 데이터베이스에 등록되어있는 염기서열이 없으면 분석이 어려우며, 유사종의 원료물질이 혼입되어있으면 분류가 어려우며, PCR 산물의 크기가(약 650bp) 커서 가공식품에 적용은 한계가 있다. 두 번째, 종 특이 프라이머를 설계하여 PCR 후 PCR 산물의 생성유무로 판별하는 방법이다. 장점으로는 분석시간이 짧고 가공식품처럼 주형유전자의 크기가 작은 경우에도 적용이 가능하다. 단점으로는 설계된 프라이머가 유사 종에서도 증폭 가능성이 있어 프라이머 설계와 유사종에 대한 검증작업이 필수적이다.

따라서 본 연구에서 개발된 소고기 등 식육 10종에 대한 종 특이 프라이머를 이용한 분석법은 축산물가공품 등의 가짜식품을 판별하기 위한 과학적 식품감시에 활용도가 매우 클 것으로 기대된다.

감사의 말

본 연구는 식품의약품안전평가원 2011년도 연구개발사업지원비(11161소비연153)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

요 약

본 연구에서는 축산물가공품 중 식육원료의 진위여부를 판별하기 위하여 분자생물학적 기법을 이용한 시험법을 개발하였다. 식육원료의 종 판별을 위한 유전자로는 미토콘드리아 DNA에 존재하는 12S 또는 16S 유전자를 대상으로 하였으며, 가공식품에 적용하기 위하여 PCR 산물의 크기는 200bp 내외가 되도록 프라이머(species-specific primer)를 설계하였다. 대상 식품원료로는 축산물 10종을 대상으로 하였으며 프라이머를 사용하여 유전자증폭(PCR) 후 전기영동 하여 예상되는 PCR 산물의 생성유무를 확인하였다. PCR을 실시한 결과 가축인 소고기, 돼지고기, 염소고기, 양고기, 사슴고기, 말고기에 대하여는 각각 131, 138, 168, 144, 191, 142bp에서, 가금류인 닭고기, 오리고기, 칠면조고기, 타조고기에 대하여는 각각 281, 186, 174, 238bp에서 예상크기의 PCR 산물을 확인하였다. 그리고 프라이머별로 유사 종에서는 비 특이적 PCR 산물(non-specific PCR product)은 생성되지 않았다. 본 연구에서 개발된 프라이머를 이용한 유전자분석법을 돼지고기 및 닭고기를 함유하는 축산물가공품, 소고기를 함유하는 복합조미식품을 대상으로 시험한 결과 적용 가능함이 확인되어 향후 축산물가공품 중 식육원료의 진위여부 판별에 활용이 가능할 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Food Sanitation Act, Ministry of Health and Welfare.
2. Padovan G. J, D. De Jong, L. P. Rodrigues, J. S. Marchini: Detection of adulteration of commercial honey samples by the 13C/12C isotope ratio, *Food Chem*., **82**, 633-636 (2003).
3. Schellenberg A., S. Chmielus, C. Schlicht, F. Camin, M. Perini, L. Bontempo, K. Heinrich, S. D. Kelly, A. Rossmann, F. thomas, E. Jamin, M. Horacek: Multielement stable isotope ratio (H, C, N, S) of honey from different european regions, *Food Chem.*, **121**, 770-777 (2010).
4. Hong EJ, Kim KH, Park SJ, Kanf JW, Kim DS, Lee HJ, Kim EJ, Lee JW, Kim SH, Lee KH and Noh BS: Discrimination of the salted cuttle fish and the salted mitra squid in economically motivated authentication food using electronic nose based on mass spectrometer. *Food Eng. Progress*. **15**, 122-129 (2011).
5. Hong EJ, Kim KW, Park SJ, Kim JE, Kim DS, Lee HJ, Kim EJ, Lee JH, Lee KH and Noh BS: Discrimination of shreds of frozen and dried alaska pollack, dried pollack and cod using electronic nose. *Food Eng. Progress*. **15**, 162-168 (2011).
6. Ampuero S., Bogdanov S., Bosset J.O.: classification of unifloral honey with an MS-based electronic nose using different sampling model, SHS, SPME and INDEX: *European Food Res. Technol*. **218**, 198-207 (2004).
7. Son HJ, Kang JH, Hong EJ, Lom CL, Choi JY, Noh BS: Authentication of sesame oil with addition of perilla oil using electronic nose based on mass spectrometry, *Korean. J. Food Sci. Technol,* **41**, 609-614 (2009).
8. Son HJ, Hong EJ, Ko SH, Choi JY, Noh BS: Identification of vegetable oil-added sesame oil by a mass spectrometer-based electronic nose: *Food Eng. Progress*, **13**, 275-281 (2009).
9. Anguita G., Martin R., Garci T., Morales P., Haza A.I.: Immunostick ELISA for detection of cow's milk in Ewe's milk and cheese using a monoclonal antibody against β-casein. *J.*

Food Prot. **59**, 436-437 (1996).
10. Anguita G., Martin R., Garci T., Morales P., Haza A.I., Gonzalez I., Sanz B., Hrnandez P.E. : A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine milk in ovine and caprine milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine β-casein. *J. Food Prot.* **60**, 64-66 (1997).
11. Fabrice T., Celia M., Catherine H.: Food and forensic molecular identification: update and challenges, *TRENDS in Biotech.*, **23**, 359-366 (2005).
12. Folmer O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Mol. Mar. Bio. and Biotech*. **3**, 294-299 (1994).
13. Hurng-Yi Wang, Mung-Pei Tsai, Ming-chung Tu, Sin-Che Lee: Universal primers for amplification of the complete mitochondrial 12S rRNA gene in vertebrates, *Zool. Studies*. **39**, 61-66 (2000).
14. Kocher T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Paabo, F. X. Vellablanca: Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers, *Proc. Natl. Acad. Sci*, **86**, 6196-6200 (1989).
15. Paul D. N. Hebert, Alina Cywinska, Shelley L. Ball, Jeremy R. deWaard. : Biological identifications through DNA Barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*. **270**, 313-321 (2003).
16. Tomoaki Mitani, Atsushi Akane, Takuma Tokiyasu, Sumitaka Yoshimura, Yutaka Okii, Manabu Yoshida: Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA Gene, *Legal Med.*, **11**, 449-450 (2009).
17. Michael T. Monaghan, Michael Balke, T. Ryan Gregory and Alfried P. Vogler: DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers, *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, **360**, 1925-1933 (2005).