pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 35, No. 6, pp. 561~566 (2020)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2020.35.6.561

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

참돔과 홍민어 판별을 위한 Multiplex PCR 검사법의 개발과 검증

최이슬 · 신지영 · 양지영*
부경대학교 식품공학과

Development and Validation of Multiplex PCR Method for the Identification of *Pagrus major* and *Sciaenops ocellatus*

Iseul Choi, Jiyoung Shin, Ji-young Yang*
Department of Food Science and Technology, Pukyoung National University, Busan, Korea

(Received October 13, 2020/Revised November 4, 2020/Accepted November 13, 2020)

ABSTRACT - Nowadays, with increase of seafood consumption, there have been increasing reports of defective seafood products. There have been incidents of red drum (*Sciaenops ocellatus*) being sold as red seabream (*Pagrus major*). In this study, we sought to develop and validate species-specific PCRs to differentiate between *P. major* and *S. ocellatus* to prevent the sale of *S. ocellatus* as *P. major*. Primers for *P. major* were designed to bind 12s rRNA and those for *S. ocellatus* were designed to bind 16s rRNA. Multiplex PCR showed a 468 bp amplicon for *P. major* and a 181 bp amplicon for *S. ocellatus*. The limit of detection of *P. major* and *S. ocellatus* was present at 1 ng each. The developed primers were validated with 19 *P. major* samples of food items purchased through the internet. Using this monitoring method, the experimental results and tested species were in agreement. Hence, the developed multiplex PCR method is considered reliable to authenticate *P. major* and *S. ocellatus*.

Key words : *Pagrus major*, *Sciaenops ocellatus*, Multiplex PCR

최근 원재료를 값비싼 다른 원료로 속여 팔거나, 표시사항을 허위로 기재하는 등의 불량식품 판매 사례가 있다[1]. 현재 불량식품은 식품의 생산, 제조, 유통 그리고 판매까지 모든 단계에서 법을 위반한 제품으로, 최근에는 국민에게 불안감을 주는 식품을 뜻한다. 이러한 불량식품은 국민의 건강을 위협할 뿐만 아니라 식품유통 질서를 어지럽히고 있다[1]. 특히 이종 혼합식품이나 가짜식품의 경우 가공 시 외관이나 관능적인 방법으로 원재료의 판별이 어려워, 가공 후에도 원재료 판별이 가능한 과학적인 판별법이 필요하다. 원재료 판별법에는 단백질 분석법, 이화학적 분석법 및 유전자 분석법 등이 있다[2]. 단백질을 이용한 판별법에는 등전점 전기영동(isoelectric focusing, IEF), 모세관 전기영동(capillary electrophoresis, CE) 등이 있으며[3], 이와 같은 단백질을 이용한 판별법은 열처리 및 건조 시 단백질이 쉽게 분해될 수 있고, 단백질 변성에 의해 감수성이 떨어진다는 단점이 있어 가공식품에 적합하지 않다[4,5]. 이화학적 분석법에는 고속 액체 크로마토그래피(High performance liquid chromatography, HPLC), 가스 크로마토그래피(gas chromatography, GC) 등이 있으며[4], 크로마토그래피를 이용한 판별법은 특정 물질의 정량 및 정성이 가능하지만 실험 방법이 복잡하고 고가의 장비를 사용해야 한다는 단점이 있다[4,6]. 유전자 분석법을 이용한 판별법은 단백질 기반의 판별법보다 특이성 및 감도가 높고, 단백질보다 열에 강하여 가공 처리된 시료에서 보다 안정적인 결과를 얻을 수 있다[7,8]. 또한 중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 일부 유전자를 증폭시키는 방법은 신속성, 특이도, 민감도, 간편성 등이 우수하여 식품원료 동정에 이용되고 있다[9].

참돔(*Pagrus major*)은 농어목(*Perciformes*) 도미과(*Sparidae*)에 속하며 전 세계적으로 33속 155종으로 알려져 있다[10]. 참돔은 우리나라 전 연안과 일본, 중국, 하와이 등의 연안에 분포하며[11], 수심 30-150 m의 대륙붕 암초지대에서 주로 서식한다[12]. 참돔은 회, 구이 등 다양한 고급 식재료로

*Correspondence to: Ji-young Yang, Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea
Tel: +82-51-629-5828, Fax: +82-51-629-5824
E-mail: jyyang@pknu.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이용되며[11], 많은 수요로 인해 세계적으로 중요한 해양 어종 중 하나이지만[13], 횟감으로 이용 시 형태학적으로 구분이 어려워 틸라피아, 홍민어 등을 참돔으로 속여 파는 불량 식품 사례가 발생하고 있다[14]. 그 중 홍민어(*Sciaenops ocellatus*)는 농어목 (*Perciformes*) 민어과(*Sciaenidae*)에 속하며 미국 대서양 연안 및 멕시코만 북부에 서식하는 온대성 어종으로[15,16], 참돔과 형태학적으로 유사하지는 않으나 횟감이나 필렛으로 가공 처리 시 판별이 어려운 불량 식품 사례가 발생하고 있다[14].

현재까지 참돔과 홍민어 판별법으로는 SDS-전기영동을 이용한 실험법[14]이 보고되었으나 전기영동 결과 어종 판별에 특이적인 band가 나타나지 않아 새로운 어종 판별 기술이 필요할 것으로 보고하고 있다[14]. 따라서 PCR을 이용하여 참돔과 홍민어를 구분하고자 하였다.

현재 PCR을 이용한 진위판별법에는 옥돔과 옥두어 유전자 분석법[4], 전갱이속 어종 판별법[17], 참서대과 어종 판별법[18] 등이 있으며, real-time PCR을 이용한 판별법으로는 옥돔과 옥두어 판별법[3], 두족류의 진위판별법[19] 등이 있다. Real-time PCR은 기존의 PCR보다 감도가 높고 신속성이 있다는 장점이 있지만[3], 고가의 시약과 장비가 필요하고 multiplex PCR 실험법에 비해 두 배의 노동력과 시약이 필요하다는 단점이 있다[4].

따라서, 본 연구에서는 형태학적으로 유사하지 않지만 회나 필렛 등으로 가공 처리 시 유사식품으로 판매될 수 있는 참돔과 홍민어의 종 특이 primer를 개발하고, 개발된 판별법의 검증 및 모니터링을 통해 참돔으로 위변조 된 사례를 사전에 예방할 수 있는 분석법을 확립하고자 하였다.

Materials and Methods

재료

표준시료로 사용된 참돔(*P. major*)과 홍민어(*S. ocellatus*)는 부산 자갈치 시장에서 구매하였다. 시료는 모두 형태학적으로 판별이 완료된 시료를 사용하였다. 모니터링에 사용된 참돔 시료는 시중에 유통 중인 필렛 제품을 구매하여 사용하였다. 표준시료와 모니터링 시료의 경우 구입 후 조직을 채취해 에펜도르프 튜브에 담은 후 -80°C에서 보관하였다.

Genomic DNA 추출

각 시료의 genomic DNA는 POWERPREP™ DNA Extraction from Food and Feed Kit (Kogenbiotech, Seoul, Korea)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 추출하였다. 추출한 genomic DNA의 농도는 OptizenTM NanoQ (K Lab Kiswire, Daejeon, Korea)을 이용하여 측정하였다.

종 특이 primer 제작

참돔과 홍민어의 판별법 개발을 위한 16s rRNA, 12s rRNA 유전자의 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov)에 등록된 미토콘드리아 전체 염기서열로부터 확보하였다. 참돔(*P. major*)은 AP002949, 홍민어(*S. ocellatus*)는 NC_016867의 유전자 염기서열을 선정하였다. 확보된 참돔과 홍민어의 미토콘드리아 DNA 서열 중에서 16s rRNA, 12s rRNA 유전자 염기서열을 이용하여 유전자 서열을 정렬하였으며 염기서열의 정렬은 clustal omega (EMBL, https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)를 이용하였다. Primer는 150-500 base pair가 되도록 하였고, Tm 값은 58-60°C의 범위를 가지며 GC 비율 30-37%를 고려하여 종 특이 primer를 설계하였다(Table 1).

Polymerase chain reacion (PCR) 반응

PCR 반응액은 각각 genomic DNA 1 μL, forward primer 1 μL, reverse primer 1 μL, prime taq premix (2X) (GENETBIO, Daejeon, Korea), 멸균증류수 17 μL를 포함하여 총 용량이 20 μL가 되도록 하였다. PCR 반응은 AllInOneCycler™ (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 PCR을 진행하였다. PCR 조건은 initial denaturation을 95°C에서 5분 실시 후, denaturation을 95°C에서 20초, annealing을 56°C에서 20초, extension을 72°C에서 30초로 30 cycle을 반복하고 최종적으로 extension 72°C에서 5분간 실시하여 PCR을 종료하였다(Table 2). 증폭된 PCR 산물은 1.5% 아가로즈 겔에 PCR product 2 μL를 로딩하고 110 V에서 20분간 전기영동을 하였다.

또한, 프라이머의 비특이적 반응을 알아보기 위해 negative control로 멸균증류수 17 μL forward primer 1 μL, reverse primer 1 μL를 넣어 확인하였다.

Table 1. Primer sequence for detection of *P. major* designed in this study

Species		Sequences	Product size (bp)	Target gene
Pagrus major	Forward	5’ – GGG TGG TTA AGA GCA AGC TTA AA – 3’	468	12s rRNA
	Reverse	5’ – CAG TGC ATC TTT CGT AGT ACC CTA – 3’		
Sciaenops ocellatus	Forward	5 ’ – AAC CCT ACC GGG CCA TCC – 3’	181	16s rRNA
	Reverse	5’ – TTG AGT GTT TTT CTA GTT GAC GGG – 3’		

Table 2. PCR reaction conditions of *P. major* and *S. ocellatus* primer

Step	Temp.	Time	Cycle
Initial denaturation	95°C	5 min	1
Denaturation	95°C	20 sec	
Annealing	56°C	20 sec	30
Extension	72°C	30 sec	
Extension	72°C	5 min	1

종 특이 primer의 검출 한계

종 특이 primer의 민감도는 참돔과 홍민어 표준시료의 genomic DNA 농도가 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0.1 ng가 되도록 희석하였다. 희석된 DNA를 single PCR과 multiplex PCR의 template DNA로 실험을 진행하였다.

모니터링

홍민어를 참돔으로 위변조하여 판매되는 현황을 알아보기 위해 참돔 필렛시료를 19건 구입 후 본 실험에서 개발된 multiplex PCR 판별법을 이용하여 모니터링을 실시하였다. 실험결과의 판정은 참돔(468 bp) band가 증폭되었을 때 참돔 양성으로 판정하였다.

Results and Discussion

참돔과 홍민어의 형태학적 분류

참돔과 홍민어를 생물 및 필렛 처리 후 형태는 Fig. 1과 같았다. 참돔은 등쪽에 작은 파란색 반점이 흩어져 있고, 홍민어는 꼬리 쪽에 점이 있는 것이 가장 큰 특징으로 원물 형태는 쉽게 비교가 가능하지만, 필렛 형태인 Fig. 1 B와 E 및 횟감 형태인 Fig. 1 C와 F를 구분하는 것은 어려운 것을 볼 수 있다. 이는 참돔과 홍민어 모두 붉은 빛을 띠기 때문인데, 자세하게 살펴보면 홍민어에는 참돔과 다르게 빗살 무늬가 여러 개로 갈라져 있는 것을 볼 수 있으나 이러한 형태적 특징만으로는 구분이 어려워, multiplex PCR을 통해 참돔과 홍민어를 구분할 수 있었다.

종 특이 프라이머 설계

참돔과 홍민어 염기서열분석은 미국 국립보건원에서 운영하고 있는 유전자은행(www.ncbi.nlm.nih)에 등록 된 염기서열을 이용하여 프라이머를 설계하였다(Table 1). 설계된 프라이머를 이용하여 실험한 결과는 Fig. 2와 같았으며 참돔은 468 bp, 홍민어는 181 bp에서 증폭 산물을 확인하였다.

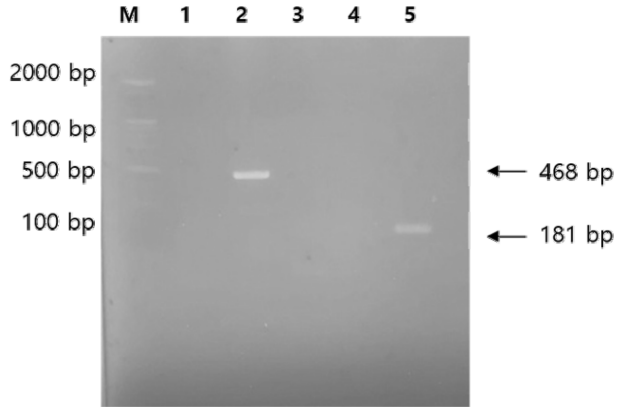


Fig. 2. Single PCR result of *P. major* and *S. ocellatus*. Lane 1; negative control, Lane 2; *P. major* gDNA + *P. major* species-specific primers, Lane 3; *P. major* gDNA + *S. ocellatus* species-specific primers, Lane 4; *S. ocellatus* gDNA + *P. major* species-specific primers, Lane 5; *S. ocellatus* gDNA + *S. ocellatus* species-specific primers, M; size marker(100 bp).

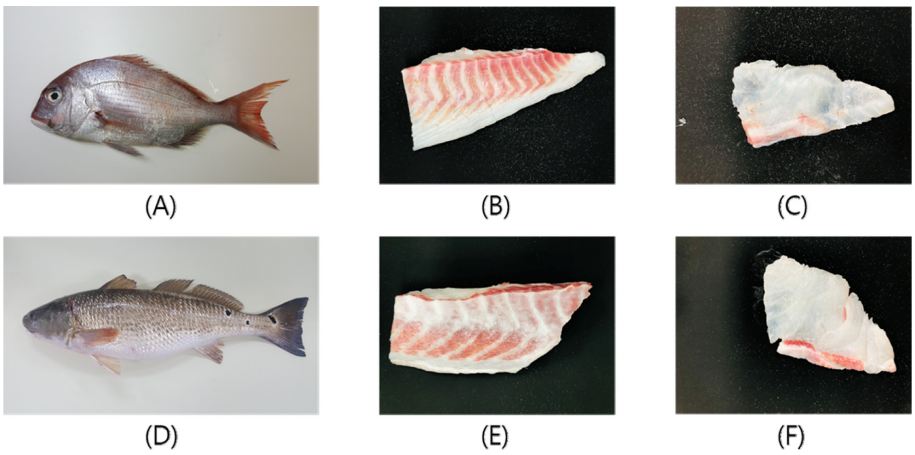


Fig. 1. Morphological comparison of *Pagrus major* and *Sciaenops ocellatus*.
(A) the original of *P. major* (B) fillet of *P. major* (C) sashimi of *P. major* (D) the original of *S. ocellatus* (E) fillet of *S. ocellatus* (F) sashimi of *S. ocellatus.*

Single PCR 및 multiplex PCR 특이도

Single PCR 결과는 Fig. 2에 나타내었으며, Multiplex PCR 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 실험 결과 참돔 primer는 참돔 template DNA만을 증폭하였고, 홍민어 primer는 홍민어 template DNA만을 증폭하였다. 참돔과 홍민어 primer에서 negative control은 증폭하지 않은 것을 볼 수 있으며 이를 통해 참돔과 홍민어에 적합한 종 특이 primer가 개발되었음을 확인하였다.

Multiplex PCR 민감도

설계된 참돔과 홍민어 primer의 민감도는 Fig. 4에 나타내었으며, 참돔 primer의 민감도는 1 ng, 홍민어 primer의 민감도는 0.1 ng 까지 검출이 확인되었다. PCR 분석법에서 template DNA 농도는 보통 10 ng으로 설정하고 있고, 본 실험에서는 민감도가 0.1-1 ng으로 나타나 PCR 실험의 일반적인 민감도를 만족함을 알 수 있었다[4].

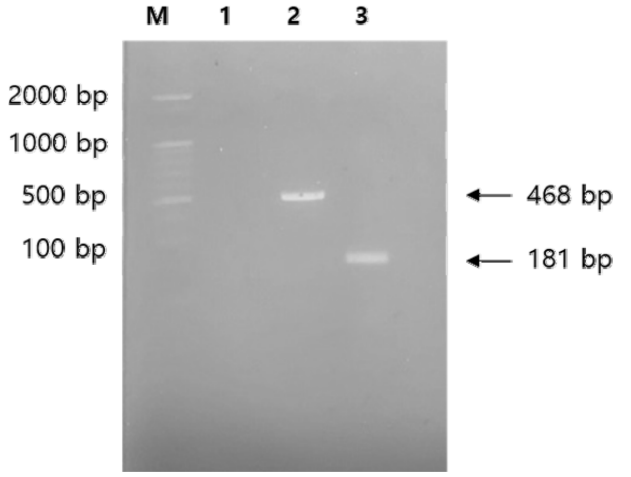


Fig. 3. Multiplex PCR result of *P. major* and *S. ocellatus*. Lane 1; negative control, Lane 2; *P. major* gDNA + *P. major* species-specific primers + *S. ocellatus* species-specific primers, Lane 3; *S. ocellatus* gDNA + *P. major* species-specific primers + *S. ocellatus* species-specific primers, M; size marker(100 bp).

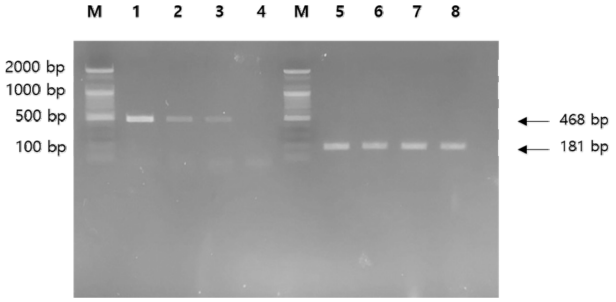
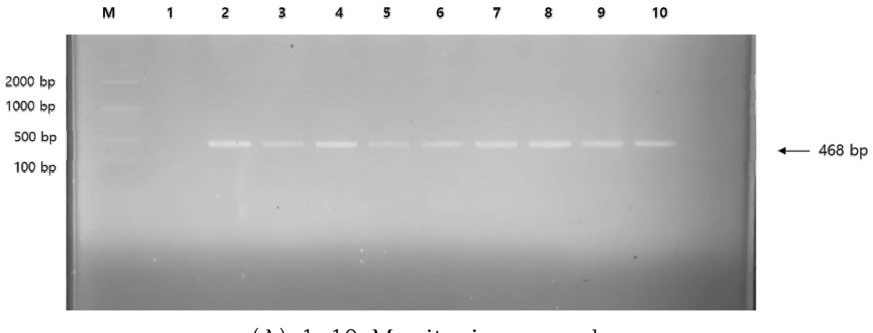
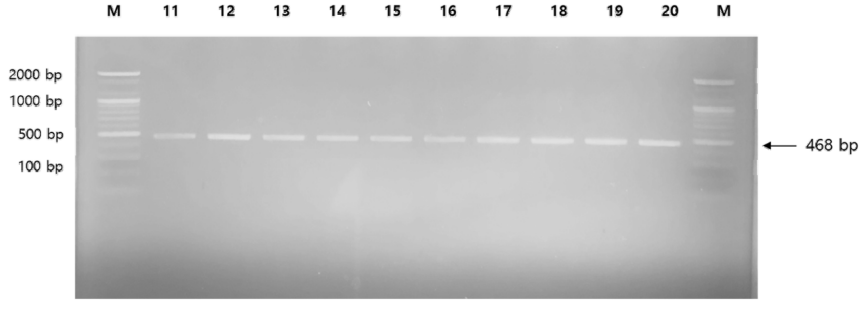


Fig. 4. Multiplex PCR sensitivity of *P. major* and *S. ocellatus*. Lnae 1; *P. major* 100 ng, Lane 2; *P. major* 10 ng, Lane 3; *P. major* 1 ng, Lane 4; *P. major* 0.1 ng, Lane 5; *S. ocellatus* 100 ng, Lane 6; *S. ocellatus* 10 ng, Lane 7; *S. ocellatus* 1 ng, Lane 8; *S. ocellatus* 0.1 ng, M; size marker(100 bp).



(A) 1-10 Monitoring sample



(B) 11-20 Monitoring sample

Fig. 5. Multiplex PCR monitoring results. Lane 1; negative control, Lane 2-20; *P. major*, M; size marker(100 bp).

Table 3. Monitoring results of *P. major* on online shopping mall

No.	Fish species	Experimental results	Decision
1	*P. major*	*P. major*	agreement
2	*P. major*	*P. major*	agreement
3	*P. major*	*P. major*	agreement
4	*P. major*	*P. major*	agreement
5	*P. major*	*P. major*	agreement
6	*P. major*	*P. major*	agreement
7	*P. major*	*P. major*	agreement
8	*P. major*	*P. major*	agreement
9	*P. major*	*P. major*	agreement
10	*P. major*	*P. major*	agreement
11	*P. major*	*P. major*	agreement
12	*P. major*	*P. major*	agreement
13	*P. major*	*P. major*	agreement
14	*P. major*	*P. major*	agreement
15	*P. major*	*P. major*	agreement
16	*P. major*	*P. major*	agreement
17	*P. major*	*P. major*	agreement
18	*P. major*	*P. major*	agreement
19	*P. major*	*P. major*	agreement

모니터링

본 실험에서는 개발된 multiplex PCR을 이용해 시중에서 판매되고 있는 참돔 필렛 시료 19건을 구입하여 모니터링 하였으며 전기영동 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 참돔의 양성 판정 결과는 Table 3에 나타내었으며 시료 19건 모두 참돔으로 판정되어 실험시료와 결과가 100% 일치함을 확인하였으며, 참돔의 위변조 사례는 조사된 경우에는 나타나지 않았다.

참돔은 회, 반건조 등의 형태로 판매되고 있어 형태학적으로 판별이 어렵다. 따라서 multiplex PCR 판별법이 유통 및 판매되고 있는 참돔 판별에 적합함을 확인할 수 있었다.

Acknowledgement

본 연구는 2020년도 식품의약품안전처의 연구개발비(17162미래사064)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

참돔은 등쪽에 푸른 반점이 흩어져 있고, 홍민어는 꼬리 쪽에 검은 점이 있어 원물 형태는 쉽게 구분할 수 있다. 그러나 횟감이나 필렛으로 이용 시 참돔과 홍민어를 구분하기 어려워, 참돔의 종 특이 primer를 개발 및 검증하고 모니터링을 통해 참돔의 위변조 사례를 조사하고자 하였다. 시료에서 gDNA를 추출하여 PCR을 진행하였으며 참돔 primer의 product size는 468 bp, 홍민어 primer의 product size는 181 bp으로 설계하였다. Multiplex PCR 결과 참돔과 홍민어에 대한 종 특이적 증폭이 확인되었다. 또한, 참돔과 홍민어 PCR 민감도 실험 결과 참돔 primer는 1 ng, 홍민어 primer는 0.1 ng 까지 밴드가 확인되었다. 모니터링 결과 참돔으로 구매한 시료 19건 모두 참돔으로 판정되었다. 따라서 본 연구에서 제작된 참돔과 홍민어 종에 대한 종 특이적 primer는 횟감 등 수산물에도 적용할 수 있어 현재 유통 및 판매되고 있는 참돔 및 홍민어 판별에 적합성을 확인하였다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Iseul Choi https://orcid.org/0000-0002-5048-8556
Jiyoung Shin https://orcid.org/0000-0002-1775-1818
Ji-young Yang https://orcid.org/0000-0002-4598-6542

References

1. Kim, K.H., Kim, Y.S., Kim, M.R., Lee, H.Y., Jung, Y.K., Lee, J.H., Chang, H.S., Park, Y.C., Kim, S.Y., Choi, J.D., Jang, Y.M., Development of species-specific primer to determine the authenticity of vegetable raw materials in food. *Food Eng. Prog.*, **18(4)**, 419- 426 (2014).
2. Kim, K.H., Lee, H.Y., Kim, Y.S., Kim, M.R., Jung, Y.K., Lee, J.H., Chang, H.Y., Park, Y.C., KIM, S.Y., Choi, J.D., Jang, Y.M., Development of species-specific PCR to determine the animal raw material. *J. Food Hyg. Saf.*, **29(4),** 347-355 (2014).
3. Chung, I.Y., Seo, Y.B., Yang, J.Y., Kim, G.D., Development and Validation of Real-time PCR to Determine Branchiostegus japonicus and B. albus Species Based on Mitochondrial DNA. *J. Life Sci.,* **27(11)**, 1331-1339 (2017).
4. Kim, N.Y.S., Yang, J.Y., Kim, J.B., Development and validation of a PCR method to discriminate between Branchiostegus japonicus and Branchiostegus albus. *J. Food Sci. Technol.,* **51(3)**, 295-299 (2019).
5. Sivaraman, B., Jeyasekaran, G., Shakila, R.J., Aanand, S., Sukumar, D., Authentication of nine snapper species by single-strand conformation polymorphism (SSCP) and forensically informative nucleotide sequencing (FINS) methods. *Food Control.,* **99**, 124-130 (2019).
6. Knuutinen, J., Harjula, P., Identification of fish species by reversed-phase high-performance liquid chromatography

with photodiode-array detection. *J. Chromatogr.*, **705(1)**, 11-21 (1998).
7. Axayacatl, R.O., Juan, P.C.G., Molecular identification of dolphinfish species (genus Coryphaena) using multiplex haplotype-specific PCR of mitochondrial DNA. *Ichthyol. Res*., **55**, 389-393 (2008).
8. Hold, G.L., Russell, V.J., Pryde, S.E., Rehbein, H., Quinteiro, J., Vidal, R., Rey-Mendez, M., Sotelo, C.G., Perez-Martin, R.I., Santos, T., Rosa, C., Development of a DNA-based method aimed at identifying the fish species present in food products. *J. Agric. Food Chem*., **49(3)**, 1175-1179 (2001).
9. Park, Y.C., Jung, Y.H., Kim, M.R., Shin, J.H., Kim, K.H. Lee, J.H., Cho, T.Y., Lee, H.J., Lee, S.J., Han, S.B., Development of Detection Method for Niphon spinosus, Epinephelus bruneus, and Epinephelus septemfasciatus using 16S rRNA Gene. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **45(1)**, 1-7 (2013).
10. Armani, A., Guardone, L., Castigliego, L., D'Amico, P., Messina, A., Malandra, R., Gianfaldoni D., Guidi, A., DNA and Mini-DNA barcoding for the identification of Porgies species (family Sparidae) of commercial interest on the international market. *Food Control.,* **50**, 589-596. (2015).
11. Jin, S.Y., Im, Y.J., Choi, J.H., Jeong, J.M., Nam, K.M., Kim, D.G., Choi, Y.J., Baeck, G.W., Maturation and Spawning of the Red Seabream (Pagrus major) in the South Sea of Korea. Fish. *Aquat. Sci.*, **53(1)**, 43-49 (2020).
12. Zenitani, H., Onishi, Y., Obata, Y., Spawning grounds of red sea bream in the east Seto Inland Sea. *Fish Sci.*, **80(3)**, 499-504 (2014).
13. Son, M.Y., Choi, K.M., Joo, M.S., Park, C.I., Molecular Characterization and Expression Analysis of the Interleukin 7 Receptor Alpha Chain (IL-7Rα) Gene from Red SeaBream (Pagrus major). *JFMSE*., **32(2)**, 560-569 (2020).
14. Chung, J.Y., Jung, Y.M., A Study on Comparative Analysis of Food Characteristics of Sea Bream and Similar Species. *Culinary Science & Hospitality Research*., **23(2**), 159-168 (2017).
15. Choi, Y.U., Rho, S., Lee, Y.D., Effect of Water Temperature and Stocking Density on Growth of Juvenile Red Drum Sciaenops ocellatus. *J. Aquaculture*., **15(3)**, 131-138 (2002).
16. Turner, T.F., Richardson, L.R., and Gold, J.R., Polymorphic microsatellite DNA markers in red drum (Sciaenops ocellatus). *Molecular Ecology.*, **7(12)**, 1771-1773 (1998).
17. Park, Y.J., Lee, M.N., Kim, E.M., Noh, E.S., Noh, J.K., Park, J.Y., Kang, J.H., Development of the Duplex PCR Method of Identifying Trachurus japonicus and Trachurus novaezelandiae. *J. Life Sci.*, **28(9)**, 1062-1067 (2018).
18. Noh, E.S., Kang, H.S., An, C.M., Park, J.Y., Kim, E.M., Kang, J.H., Rapid and Specific Identification of Genus Cynoglossus by Multiplex PCR Assays Using Species-specific Derived from the COI Region. *J. Life Sci.*, **26(9)**, 1007-1014 (2016).
19. Chung, I.Y., Seo, Y.B., Yang, J.Y., Kwan, K.S., Kim, G.D., Development and Validation of Quick and Accurate Cephalopods Grouping System in Fishery Products by Real-time Quantitative PCR Based on Mitochondrial DNA. *J. Food Hyg. Saf.*, **33(4)**, 280-288 (2018).
20. Kim, H.S., Seo, Y.B., Choi, S.S., Kim, J.H., Shin, J.Y., Yang, J.Y., Kim, G.D., Development and Validation of Multiplex Polymerase Chain Reaction to Determine Squid Species Based on 16s rRNA Gene. *J. Food Hyg. Saf*., **30(1),** 43-50 (2015).