

Research Article

Transcriptome analysis for DEG profiling related to meat color in pigs

Sangwon Yoon^{1,2}, Yu-Sam Kim¹, Hee Jung Baek^{1,4}, Dae-Yeong Koh³, Ill-Joo Lee³, Myunghum Park¹, Jung Woo Choi⁴, Dongwon Seo¹¹Research Institute, TNT Research Ltd., Sejong 30141, Korea²Department of Bio-AI Convergence, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea³Darby Genetics Inc., Anseong 17529, Korea⁴Department of Animal Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea***Corresponding author:** jungwoo@kangwon.ac.kr, dwseo@tntresearch.co.kr

ABSTRACT

Studies have shown that consumers prioritize meat color, an easily evaluated trait, when selecting meat products. However, meat color traits are only observable post-slaughter, making them difficult to target for selective breeding. Therefore, this study aimed to identify potential candidate genes associated with pork meat color traits by conducting a transcriptome analysis on carcasses, measuring L*, a*, and b* values of meat color, and extracting differentially expressed genes (DEGs). Notably, previously reported candidate genes associated with meat color were not identified in this study, but the Gene Ontology (GO) analysis provided insights into functional information potentially linked to meat color. The limitations in detecting direct candidate genes for meat color may be attributed to challenges in meat sampling and the constraints of blood sample collection. This study suggests the need for comparative research between meat and blood, as similar functional genes could be identified in blood, and correlations with postmortem processes, such as rigor mortis, could be confirmed in future meat color studies.

Keywords: Transcriptome, Pig, DEG, Meat color, Candidate genes

INTRODUCTION

한국은 급격한 산업의 고도화 시기를 겪으며 돼지 품종 개량 기술과 사육기술 등이 발달하면서 양돈산업의 양적성장을 이룩해왔다. 하지만 최근의 소비자들은 식육의 가격도 중요하지만 고품질, 친환경, 안전한 먹거리에 대한 관심이 증가하면서 품질 특성에 대한 다원화 성향이 강해지고 있는 실정이다(Kang et al., 2024). 이러한 특성을 따라 양돈산업도 육질 특성을 부각하거나 브랜드를 생성하고 차별화된 수입육류와 경쟁하기 위한 다양한 품질 기준을 개발하고 있다.

소비자의 식육 선택에 있어서 가격을 제외한 나머지 판단 기준은 육안으로 판단 가능한 육색과 지방 분포가 가장 주요한 선택 결정의 요인이 된다. 이는 많은 연구에서도 소비자의 관점에서 식육의 품질을 판단하는 기준이 되며 선호도의 가장 큰 요인으로 선정하고 있다(Cardona et al., 2023; Mancini, 2013). 선호하는 육색은 개인과 그룹, 국가마다 다른 경향성이 있지만 대부분 진한 붉은색, 밝은 붉은색 돼지고기가 선호되었고, 이후 마블링을 함께 고려 요소로 선택하고 있다(Simunović et al., 2024). 한국에서도 같은 선호도를 나타내어 밝고 붉은 색을 선호하고 지방이 고르게 분포되어 있는 식육을 선호하는 내용이 보고되었다(Ko et al., 2023). 이러한 육색에 대한 선호도는 보통 신선도를 평가하는 기준으로, 고른 지방의 분포는 부드러운 식감과 육즙을 기대하는 척도로 활용되는 내용들이 보고되고 있다.

가축개량에 있어서 소비자의 선호동향은 필수적으로 파악해서 소비자의 요구에 대한 시장의 공급이 필요하기 때문에 소비자 선호도가 높은 육색에 대한 개량은 빠른 적용이 필요하다. 개체의 빠른 개량을 위해서 기능후보유전자를 탐색할 때는 마커도움선발에 활용할 목적으로 유전자 마커 발굴 연구를 수행해 왔지만 최근에는 유전체 정보를 이용한 선발도 가능하기 때문에 마커의 발굴이 없이도 빠른 개량이 가능하다(Miar et al., 2015). 하지만 유전체 선발을 적용하는 과정에도 유전자 마커 발굴이 병행이되고, 해당 유전자의 표현형 영향력의 비율이 산출된다면 유전체 선발의 가중치를 제공하는 방법으로 빠른 개량 및 생산이 가능할 수 있다.

전사체 분석은 유전체 전체의 기능 유전자 중에서 표현형의 차이에 영향을 줄 수 있는 유전자 발현의 양상을 확인하여 표현형 차이에 기인하는 원인유전자를 발굴하는데 보다 빠르게 접근할 수 있는 장점을 가지고 있다(Sarup et al., 2011). 물론 차등 발현 유전자들이 모두 타겟한 형질의 표현형 변화에 관여하는 정보는 아닐 수 있지만 적은 샘플 그룹의 차이로 유전자 발현의 차이를 확인하는 것은 통계분석을 위해 많은 샘플을 수집하여 연관성 분석을 하는 방법 보다는 효율적일 수 있다. 이 후 후보리스트를 줄여 놓은 상태에서 유전체 변이에 대한 연관성 정보를 매칭한다면 보다 빠르고 효율적으로 후보유전자를 발굴할 수 있는 방법이 될 수 있다.

따라서 본 연구에서는 한국 소비자들의 식육 선택의 1번 기준이 되는 육색에 대한 유전자를 찾고 이를 유전체 선발에 활용할 수 있는 후보변이로 활용할 수 있는 양적형질 연관 단일염기다형(Quantitative Trait Nucleotide; QTN)을 발굴하고자 본 연구를 수행하였다.

MATERIALS AND METHODS

공시동물 및 RNA 추출

돼지의 육색 형질에 대한 전사체 분석을 위해 다비육종 종돈회사에서 도축된 샘플의 혈액을 제공받아 RNA 추출에 활용했다. RNA 추출은 QIAzol® Lysis Reagent와 RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, Germany)를 이용해서 제조사의 매뉴얼을 참고하여 추출에 활용했다.

육색 측정

분석에 사용할 돼지고기 시료는 돼지 등심에서 채취된 고기를 도축 후 냉장 상태에서 최소 24시간 계류 후 측정에 사용했다. 돼지고기 육색 측정을 위해 휴대용 색차계 CR-400를 사용해서 시료를 실온에서 30분간 방치한 적정 온도의 고기 표면을 매끄럽고 이물질이 없도록 준비했다. 색차계는 돼지고기 시료 표면에 수직으로 대고 각 시료당 L, a, b 값을 각 3회 측정하여 평균값을 기록했으며 측정 위치는 시료의 중간 부분에서 측정하고, 지방과 근육이 가급적 혼합되지 않은 위치를 기록했다. 측정된 육색 정보는 L, a, b 값의 차이에 따라 그룹을 설정하였고, 그룹 설정 정보는 Table 1에 제시 되어있다.

RNA Sequencing 및 DEG Profiling

추출된 Total RNA 농도는 Quant-IT RiboGreen(Invitrogen, #R11490)을 사용하여 측정되었다. Total RNA의 품질을 평가하기 위해 샘플은 TapeStation RNA screentape(Agilent, #5067-5576)에서 분석되었고 RNA Library 구성을 위해 RIN (RNA Integrity Number) 값이 7.0 이상인 고품질의 RNA가 사용되었다.

각 샘플에 대해 1µg의 Total RNA로 독립적인 라이브러리가 준비하기위해 Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit(Illumina, Inc., San Diego, CA, USA, #20020595)를 사용했다. 실험과정의 첫 번째 단계는 poly - T가 부착된 자성 비드를 사용하여 poly - A가 포함된 mRNA 분자를 정제해 2가 양이온과 높은 온도 하에서 작은 조각으로 분해되었다. 절단된 RNA 조각은 SuperScript II 역전사 효소(Invitrogen, #18064014)와 랜덤 프라이머를 사용하여 첫 번째 가닥의 cDNA로 복사한 후, DNA Polymerase I, RNase H 및 dUTP를 사용하여 두 번째 가닥의 cDNA 합성을 수행하였다. 이러한 cDNA 조각들은 말단 복구 과정, 단일 'A' 염기 추가, 그리고 어댑터 연결 과정을 거쳐 최종 cDNA 라이브러리를 생성하기 위해 PCR로 증폭했다.

준비된 라이브러리는 KAPA Library Quantification 키트를 사용하여 Illumina 시퀀싱 플랫폼에 대해 qPCR 정량 프로토콜 가이드 (KAPA BIOSYSTEMS, #KK4854)에 따라 정량하였고, TapeStation D1000 ScreenTape(Agilent Technologies, #5067-5582)를 사용하여 품질을 검증했다. 인덱싱된 라이브러리는 Illumina NovaSeq(Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)로 Paired end (2×100 bp) 시퀀싱 방법으로 read를 확보했다.

Data Processing and Analysis

확보된 paired-end read는 분석을 시작하기 전에 Trimmomatic v0.38을 사용하여 어댑터 서열을 제거하고 품질이 낮은 염기들을 제거했고 정렬된 read는 HISAT v2.1.0을 사용하여 *Sus scrofa*(Sscrofa11.1) 참조서열에 alignment를 수행하였다(Kim et al., 2015). 참조 유전체 서열과 유전자 주석 데이터는 각각 NCBI Genome assembly와 NCBI RefSeq 데이터베이스에서 다운로드되었다. 정렬된 데이터(SAM 파일 형식)는 SAMtools v1.9를 사용하여 정렬 및 색인화 후, StringTie v2.1.3b (Pertea et al., 2016, 2015)를 사용하여 전사체를 mapping하고 FPKM(Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) 및 TPM(Transcripts Per Million)으로 전사체 수준을 정량화 했다.

Differential Gene Expression Analysis

차등 유전자 발현 유전자(DEG)에 대한 통계 분석은 DESeq2 v1.38.3을 사용하여 수행되었다 (Love et al., 2014). QC 단계에서는 모든 샘플에서 0이 아닌 카운트를 가진 유전자들을 선택하고 샘플 간 발현 유사성을 확인하기 위해 PCA(주성분 분석)를 확인했다. 필터링된 데이터 세트는 샘플 간 라이브러리 크기의 차이를 보정하기 위해 RLE Normalization (Relative Log Expression)을 수행하였다. 차등 발현 유전자의 통계적 유의성은 DESeq2 nbinom WaldTest로 확인하고, Fold change와 p-value는 WaldTest 결과로 확인하였다 (Love et al., 2014). 모든 p-value는 false discovery rate(FDR)를 제어하기 위해 Benjamini-Hochberg 알고리즘으로 보정했다. 유의미한 유전자 목록은 $|\text{fold change}| \geq 2$ 및 raw p-value < 0.05의 기준으로 필터링되었고, Gene enrichment와 기능 주석 분석은 gProfiler를 사용하여 GO(Gene Ontology) 데이터베이스를 대상으로 수행되었다 (Raudvere et al., 2019). gProfiler 결과에서 보고된 조정된 p-value는 단측 hypergeometric test에서 파생했고 Benjamini-Hochberg 방법으로 보정되었다. 차등 발현 유전자에 대한 모든 데이터 분석 및 시각화는 R 4.2.2(www.r-project.org)를 사용하여 수행되었다.

RESULTS

수집된 돈육샘플의 육색분포

수집된 샘플에 대한 색차계(CIE) 측정 결과, 각 그룹 간의 L*, a*, b* 값에서 유의미한 차이가 확인되었다(Table 1, Figure 1). G1/G2 그룹의 L* 값은 최소 39.89에서 최대 52.96으로 나타났으며, 그룹 간 평균 차이는 약 9로 확인되었다. G3/G4 그룹의 a* 값은 최소 15.26에서 최대 20.95로, 그룹 간 평균 차이는 3.85로 나타났고, G5/G6 b* 값은 최소 4.37에서 최대 10.21로 확인되었으며, 평균 차이는 3.18로 확인되었다. 각 그룹의 차이에 대한 T검정 결과, 모두 유의미한 차이가 있는 것으로 확인되었으며, 이를 바탕으로 그룹 간 유전자 발현 차이를 분석했다.

생산된 전사체 sequencing read의 QC

생산된 raw read count는 11개 샘플 간의 정량 비교분석을 용이하게 하기 위해 Logarithm 변환 및 rlog(Regularized Logarithm) 변환을 통해 데이터의 분산을 안정화 했다(Supp. Figure 1). 각 샘플에 대한 rlog 변환 값을 이용하여 샘플 간의 유사성 정도를 피어슨 상관관계 수로 분석한 결과 평균 0.98~1의 유사성을 확인하였다. 데이터 정규화를 통해 총 28,232개 유전자의 발현 정보를 획득하였고, 이 중에서 read count가 0으로 확인되는 14,210개의 유전자 발현정보는 제거하고 총 14,022개 유전자 발현 정보를 획득하였다(Figure 2B).

획득한 유전자 발현정보는 PCA 분석을 통해 샘플간 발현 정보의 차이를 도식화 했고, 그 결과 그룹 간의 뚜렷한 차이 또는 outlier는 확인되지 않았다(Figure 2A).

육색에 대한 차등발현 유전자(DEG) 분석

14,022개 차등발현 유전자 중에서 발현 값을 FC(Fold Change)로 변환하여 up-, down- 발현 유전자들을 비교한 결과 G1/G2(L*)의 비교에서는 95/53(up-, down-)개, G3/G4(a*) 비교에서는 468/195개, G5/G6(b*) 비교에서는 89/64개가 각각 확인되었다. 확인된 차등 발현 유전자 중에서 p-value (0.05)를 충족하는 유전자들을 다시 필터링을 했을 때는 G1/G2는 66/32개, G3/G4는 429/158개, G5/G6는 42/42개로 최종 확인되는 것을 알 수 있었다(Figure 3A). 그룹비교에서는 G3/G4가 가장 많은 차등 발현유전자를 검출할 수 있어서 redness(a*)에 영향을 주는 유전자 발견의 가능성이 높은 것을 확인하였다. 차등발현 유전자들을 이용해서 각 그룹 비교 군별로 volcano plot을 작성한 결과 Figure 3의 B-D와 같이 발현되는 유전자를 확인할 수 있었다.

각 비교군에 대해서 유전자의 샘플, 유전자별 two-way hierarchical clustering에 대한 heatmap과 계통수 분석에 대해서도 각 그룹이 구분되며 다른 유전자발현 패턴이 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4). 특히, redness 형질과 관련된 G3/G4의 그룹비교에서 5603, 5709 샘플은 같은 G3 그룹 중에서도 뚜렷히 다른 유전자 발현 패턴이 관찰되는데 이 두샘플은 G3 그룹 중에서 a* 값이 가장 낮은 두 개체의 샘플인 것으로 확인된다(Figure 4B).

상위 20개의 significant DEG를 확인했을 때, L*, b*에 대해서는 각각 기능이 알려지지 않은 유전자 및 long noncoding RNA(lncRNA), pseudogene 들이 확인되는 것을 알 수 있었고, 차등발현 유전자가 가장 많이 검출된 a*에 대해서는 LOC102160213을 제외한 비교적 기능이 알려진 protein_coding gene 들이 확인되었다(Table 2).

차등발현 유전자의 GO enrichment 분석

확보된 차등발현 유전자에 대해서 기능 정보를 확인하기 위해 GO (Gene Ontology) enrichment 분석을 수행하였다. 그 결과 Biological Process, Molecular Function에 대해서는 상위 10가지 기능을 확인할 수 있었고, Cellular Component에 대해서는 4개의 기능 정보를 확인할 수 있었다(Figure 5). GO enrichment 분석에서 L* 값을 측정된 G1/G2 그룹비교에 대해서는 기능정보들을 확인할 수 없었고, 주로 a*값의 G3/G4 그룹비교에서 유의미한 정보를 확인할 수 있었다. b*값을 측정된 G5/G6 그룹비교의 기능정보는 다른 그룹의 기능정보와는 관련이 없는 cardiac ventricle development, cardiac chamber morphogenesis의 두가지 기능 정보만 확인이 되었다.

DISCUSSION

이전의 연구들에서 육색과 연관성이 보고된 유전자는 MB(Myoglobin), CAST(Calpastatin), SLC40A1(Solute Carrier Family 40 Member1), COX(Cytochrome c oxidase), PRKAG3(Protein Kinase, AMP-Activated, Gamma 3 Non-Catalytic Subunit), ACTA1(Actin Alpha 1, Skeletal Muscle), FATP(Fatty Acid Transport Protein), SOD1 (Superoxide Dismutase 1) 등이 보고되어 왔지만 사례가 한정적이다(Harris et al., 2001; Lim et al., 2016; Mancini and Hunt, 2005). 이 중에서 MB, CAST, SLC40A1, COX의 유전자는 주로 식육의 보존과정에서 미오글로빈의 산화 환원 또는 단백질 분해, 철분 대사에 영향을 주어 장기 보존에 영향을 줄 수 있는 유전자로 보고되어 있다. 반면 PRKAG3, ACTA1, FATP, SOD1 유전자 등은 근육내 에너지 대사 및 근육의 단백질 상태, 항산화 또는 지방산 운반 등에 관여하여 도축 후 일어나는 품질에 영향을 주는 유전자로 보고되고 있다(Saini et al., 2018; Uimari and Sironen, 2014). 이 유전자들은 모두 단기 또는 장기적으로 육색에 영향을 줄 수 있는 유전자들이고, 식육의 유통 단계에 따라 영향을 미치는 유전자가 될 수 있는 후보에 속한다고 할 수 있다. 하지만 본 연구에서 확인한 육색의 L*, a*, b*값에 대한 차등발현 유전자를 검출한 결과에서 해당 후보유전자들은 확인되지 않았다.

GO 기능들을 비교해 보았을 때는 육색과 관련된 기능들은 우선 Biological Process에서는 미오글로빈의 산화 및 환원과정(Oxidation-Reduction Process), 지방산 대사(Fatty Acid Metabolic Process), 철 이온의 수송 (Iron Ion Transport), 항산화 방어(Response

to Oxidative Stress), 단백질 분해(Proteolysis), 포도당 대사(Glucose Metabolic Process), 근육 발달(Muscle development), ATP생성(ATP Biosynthetic Process), 지질산화 (Lipid Oxidation) 등의 직접적인 연관성들을 보고하고 있다(Ding et al., 2022; Faustman et al., 2010; Klont et al., 1998; Terlouw et al., 2021). Cellular Component의 기능은 근섬유(Muscle fiber), 미오글로빈 복합체(Myoglobin Complex), 미토콘드리아(Mitochondria), 라이소좀(Lysosome), 세포질(Cytoplasm), 지방 방울(Lipid Droplet), 세포막(Plasma Membrane), 소포체 (Endoplasmic Reticulum) 등의 연관성들이 보고되어 있다(Kwon et al., 2024). 유전자가 직접 관여할 것으로 예상되는 Molecular Function에서는 산화 환원 효소 활성(Oxidoreductase Activity), 산소 결합(Oxygen Binding), 철 이온 결합(Iron Ion Binding), 항산화 활성 (Antioxidant Activity), 지방산 결합(Fatty Acid Binding), 프로테아제 억제제 활성(Protease Inhibitor Activity), ATP 결합(ATP Binding), 전자 전달 활성(Electron Transfer Activity)의 기능들의 연관성이 보고되어 있다. (Poveda-Arteaga et al., 2023; Sibut et al., 2011)

본 연구의 결과에서 확보된 GO 기능 정보들이 해당 내용들과 모두 일치하지는 않지만 Biological process의 response to oxidative stress, response to reactive oxygen species, oxygen transport이 산화환원 및 항산화 방어기작과 연관되었을 가능성을 가지고 있는 것으로 추측된다(Figure 5, Supp. Figure 2). response to metal ion의 경우에도 철 이온의 수송 기능과의 연관성을 추측해 볼 수 있다. Molecular function의 protein domain specific binding, oxygen binding, GTPase regulator activity는 단백질 분해 합성 및 항산화와 관련된 기능들이기 때문에 주요한 연관성을 나타낼 수 있을 것으로 사료된다(Figure 5, Supp. Figure 4). Cellular component에서도 세포막 과 관련된 side of membrane, external side of plasma membrane의 관련성을 함께 예측해 볼 수 있다(Figure 5, Supp. Figure 3). DEG top10 유전자들 리스트들도 확인된 기능들을 대부분 포함하고 있어 이 기능들에 대한 육색과의 연관성을 확인해 볼 수 있다(Table2, Supp Table1). 하지만 유의적인 연관성 정보들이 대부분 a*(redness)에 집중되어 있어 L*, b*의 연관성은 높지 않은 것으로 판단된다.

식육의 붉은색은 소비자의 품질평가의 주요 지표중에 하나이며 이는 주로 미오글로빈의 산화-환원 상태와 항산화 방어기작에 영향을 받는 것으로 알려져 있다(“Ramanathan | Recent Updates in Meat Color Research: Integrating Traditional and High-Throughput Approaches | Meat and Muscle Biology,” n.d.; Ramanathan et al., 2020; Skaperda et al., 2021). 이는 항산화 기작이 발현될 경우 미오글로빈과 근육의 산화를 방지해 고기의 선홍색을 유지하고, 산화 스트레스가 증가하는 경우 미오글로빈이 빠르게 산화해 a*를 감소하게 됨을 의미한다. 철 이온 또한, 고기의 선홍색을 나타내는 옥시미오글로빈 형성에 주요한 영향을 주고, 철 이온이 산화됨에 따라 메트미오글로빈이 형성되어 식육의 a*를 감소하는데 영향을 준다(Poveda-Arteaga et al., 2023). 따라서, 산화-환원 반응과 항산화 방어 기작과 철 이온 수송의 기능들은 식육의 a*를 유지 또는 감소시키는 주요 원인으로 예상해 볼 수 있다.

단백질의 합성과정에서는 인산화가 고기의 색상 안정성과 관련이 있고, 이는 미오글로빈의 산화-환원 상태와 밀접하게 연관되어 색을 더욱 오래 유지하는데 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Terlouw et al., 2021; Zhang et al., 2021). 또한 단백질 분해 과정에서 과도한 단백질의 산화는 식육의 물리적 구조를 변화시켜 색 안정성을 저하시켜 a*를 감소하는 결과를 발생시킬 수 있다(Pérez-Andrés et al., 2020). 세포막의 구조적 성분인 콜레스테롤과 인지질의 경우에도 식육의 지질 산화를 촉진해 붉은색의 감소를 야기할 수 있고 이는 결국 미오글로빈의 산화-환원에 영향을 주는 인자로 활용된다.

하지만 본 연구에서는 도축현장에서 샘플을 채취하는 한계점 때문에 부득이 식육 샘플이 아닌 혈액샘플을 채취하게 되었고, 이후 육색을 측정할 자료와 매칭하여 전사체 분석을 시도했다. 이러한 접근은 이전의 기능후보유전자들로 확인된 MB, CAST, SLC40A1, COX, PRKAG3, ACTA1, FATP, SOD1의 유전자들이 검출이 되지 않은 이유와 연결될 수 있을 것으로 예상하고 있지만 GO의 기능들에서는 일부 일치하는 연관성 정보들이 도출된 것으로 보아 육색에 영향을 주는 polygenic effect의 식육 외의 혈액순환에서 영향을 주는 요인들이 같은 기능에 연결될 수 있는 부분에 해당될 수 있음을 시사한다. 하지만, 이 부분에서도 샘플 수와 식육 조직과의 비교 연구가 함께 수행될 필요가 있으며 차후 연구에서는 비교 그룹 설정 및 발견된 DEG에서 추출한 변이 정보에 대한 GWAS의 접근으로도 연구내용을 보완할 필요가 있을 것으로 사료된다.

CONCLUSION

본 연구에서는 기존에 육색과 관련이 있는 것으로 보고된 유전자들이 전사체 분석 결과에서 검출되지 않았지만 이들이 가진 GO

기능정보와 관련된 분석에서 미오글로빈의 산화-환원 과정과 지방 대사, 철 이온수송, 항산화 방어, 단백질 분해, 세포막 구성성분이 육색에 영향을 주는 인자로 확인되었다. 본 연구의 접근이 샘플 채취의 한계로 혈액을 이용한 DEG 결과를 도출하였지만 이러한 경향은 육색 연구에서 조직과 혈액의 비교 분석도 필요할 수 있음을 생각해 볼 수 있고, 향후 GWAS 분석을 통해서 DEG의 변이들을 추출하는데 활용할 필요성이 있음을 확인하였다.

CONFLICT OF INTERESTS

No potential conflict of interest relevant to this article is reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by the Rural Development Administration, South Korea (grant number RS-2023-00231989)

REFERENCES

- Cardona, M., Izquierdo, D., Barat, J.M., Fernández-Segovia, I., 2023. Intrinsic and extrinsic attributes that influence choice of meat and meat products: techniques used in their identification. *Eur. Food Res. Technol.* 249, 2485–2514. <https://doi.org/10.1007/s00217-023-04301-1>
- Ding, Z., Wei, Q., Liu, C., Zhang, H., Huang, F., 2022. The Quality Changes and Proteomic Analysis of Cattle Muscle Postmortem during Rigor Mortis. *Foods* 11, 217. <https://doi.org/10.3390/foods11020217>
- Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R., Suman, S.P., 2010. Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Sci.* 86, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.025>
- Harris, S.E., Huff-Lonergan, E., Lonergan, S.M., Jones, W.R., Rankins, D., 2001. Antioxidant status affects color stability and tenderness of calcium chloride-injected beef. *J. Anim. Sci.* 79, 666–677. <https://doi.org/10.2527/2001.793666x>
- Kang, S., Gang, G., Go, G., 2024. Ambivalence towards pork belly: exploring its significance and contradictions from the perspectives of the food industry and nutritional science. *Food Sci. Biotechnol.* 33, 23–31. <https://doi.org/10.1007/s10068-023-01429-4>
- Kim, D., Langmead, B., Salzberg, S.L., 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods* 12, 357–360. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>
- Klont, R.E., Brocks, L., Eikelenboom, G., 1998. Muscle fibre type and meat quality. *Meat Sci.* 49, S219–S229. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(98\)90050-x](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(98)90050-x)
- Ko, E., Jeong, K., Oh, H., Park, Y., Choi, J., Lee, E., 2023. A deep learning-based framework for predicting pork preference. *Curr. Res. Food Sci.* 6, 100495. <https://doi.org/10.1016/j.crf.2023.100495>
- Kwon, D., Park, N., Wy, S., Lee, D., Park, W., Chai, H.-H., Cho, I.-C., Lee, J., Kwon, K., Kim, H., Moon, Y., Kim, Juyeon, Kim, Jaebum, 2024. Identification and characterization of structural variants related to meat quality in pigs using chromosome-level genome assemblies. *BMC Genom.* 25, 299. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10225-1>
- Lim, K.-S., Lee, K.-T., Lee, S.-W., Chai, H.-H., Jang, G., Hong, K.-C., Kim, T.-H., 2016. Genomic structure, expression and association study of the porcine FSD2. *Mol. Biol. Rep.* 43, 1011–1018. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4029-4>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Mancini, R., 2013. The Science of Meat Quality 177–198. <https://doi.org/10.1002/9781118530726.ch9>
- Mancini, R.A., Hunt, M.C., 2005. Current research in meat color. *Meat Sci.* 71, 100–121. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.03.003>
- Miar, Y., Plastow, G., Wang, Z., 2015. Genomic Selection, a New Era for Pork Quality Improvement. *Springer Sci. Rev.* 3, 27–37. <https://doi.org/10.1007/s40362-015-0029-3>

- Pérez-Andrés, J.M., Crobotova, J., Harrison, S.M., Brunton, N.P., Cullen, P.J., Rustad, T., Tiwari, B.K., 2020. Effect of Cold Plasma on Meat Cholesterol and Lipid Oxidation. *Foods* 9, 1786. <https://doi.org/10.3390/foods9121786>
- Perteau, M., Kim, D., Perteau, G.M., Leek, J.T., Salzberg, S.L., 2016. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat. Protoc.* 11, 1650–1667. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.095>
- Perteau, M., Perteau, G.M., Antonescu, C.M., Chang, T.-C., Mendell, J.T., Salzberg, S.L., 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat. Biotechnol.* 33, 290–295. <https://doi.org/10.1038/nbt.3122>
- Poveda-Arteaga, A., Krell, J., Gibis, M., Heinz, V., Terjung, N., Tomasevic, I., 2023. Intrinsic and Extrinsic Factors Affecting the Color of Fresh Beef Meat—Comprehensive Review. *Appl. Sci.* 13, 4382. <https://doi.org/10.3390/app13074382>
- Ramanathan | Recent Updates in Meat Color Research: Integrating Traditional and High-Throughput Approaches | Meat and Muscle Biology [WWW Document], n.d. URL <https://www.iastatedigitalpress.com/mmb/article/id/9598/> (accessed 9.22.24).
- Ramanathan, R., Hunt, M.C., Mancini, R.A., Nair, M.N., Denzer, M.L., Suman, S.P., Mafi, G.G., 2020. Recent Updates in Meat Color Research: Integrating Traditional and High-Throughput Approaches. *Meat Muscle Biol.* 4. <https://doi.org/10.22175/mmb.9598>
- Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H., Vilo, J., 2019. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res.* 47, W191–W198. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz369>
- Saini, B.L., Gaur, G.K., Sahoo, N.R., Mendiratta, S.K., Kumar, A., Naha, B.C., Baranwal, A., Yadav, V., Jaiswal, R.K., 2018. Polymorphism distribution of RYR1, PRKAG3, HFABP, MYF-5 and MC4R genes in crossbred pigs. *Mol. Biol. Rep.* 45, 1575–1585. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4263-z>
- Sarup, P., Sørensen, J.G., Kristensen, T.N., Hoffmann, A.A., Loeschcke, V., Paige, K.N., Sørensen, P., 2011. Candidate Genes Detected in Transcriptome Studies Are Strongly Dependent on Genetic Background. *PLoS ONE* 6, e15644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015644>
- Sibut, V., Hennequet-Antier, C., Bihan-Duval, E.L., Marthey, S., Duclos, M.J., Berri, C., 2011. Identification of differentially expressed genes in chickens differing in muscle glycogen content and meat quality. *BMC Genom.* 12, 112. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-112>
- Simunović, S., Tomasevic, I., Djordjevic, V.Ž., Baltić, T., Simunovic, S., Ćirić, J., Djekic, I., 2024. Meat Color, Marbling, and the Evaluation of Defects in Beef and Pork at the Point of Purchase. *Appl. Sci.* 14, 6797. <https://doi.org/10.3390/app14156797>
- Skaperda, Z., Argyriadou, A., Nechalioti, P.M., Alvanou, M., Makri, S., Bouroutzika, E., Kyriazis, I.D., Tekos, F., Veskoukis, A.S., Kallitsis, T., Mesnage, R., Arsenos, G., Kouretas, D., 2021. Redox Biomarker Baseline Levels in Cattle Tissues and Their Relationships with Meat Quality. *Antioxidants* 10, 958. <https://doi.org/10.3390/antiox10060958>
- Terlouw, E.M.C., Picard, B., Deiss, V., Berri, C., Hocquette, J.-F., Lebret, B., Lefèvre, F., Hamill, R., Gagaoua, M., 2021. Understanding the Determination of Meat Quality Using Biochemical Characteristics of the Muscle: Stress at Slaughter and Other Missing Keys. *Foods* 10, 84. <https://doi.org/10.3390/foods10010084>
- Uimari, P., Sironen, A., 2014. A combination of two variants in PRKAG3 is needed for a positive effect on meat quality in pigs. *BMC Genet.* 15, 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-29>
- Zhang, D., Li, X., Chen, L., Hou, C., Wang, Z., 2021. Protein Phosphorylation and Meat Quality 23–47. https://doi.org/10.1007/978-981-15-9441-0_3