

멍게 물렁증의 원인충인 *Azumiobodo hoyamushi*에 대한 유기산의 살충효과 연구

이지훈 · 박경일 · 박관하[†]

군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과

Anti-protozoal effect of organic acids against *Azumiobodo hoyamushi* that causes soft tunic syndrome to *Halocynthia roretzi*

Ji Hoon Lee, Kyung Il Park and Kwan Ha Park[†]

Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology,
Kunsan National University, 54150, Korea

Economic loss by soft tunic syndrome of edible ascidian, *Halocynthia roretzi* has become a serious problem. Recently, it has discovered that the cause of this syndrome is infection by a protozoan parasite *Azumiobodo hoyamushi*. However, only a few studies have been conducted to control this parasitic disease. In a previous research, non-specific disinfectants have been found to be effective in controlling the causative parasite. In an attempt to eradicate this causative parasite, organic acids were tested in this study to evaluate their *in vitro* and *in vivo* efficacy. *In vitro* tests showed that 8 different organic acids used in this study were moderately or highly effective with protozoan-killing effects ($EC_{50}=153\sim 275\ \mu\text{g/ml}$). Despite weak *in vivo* penetration of organic acids into the tunic tissues, treatment with high concentration reduced the mortality of ascidian caused by infection the parasite, indicating that we might be able to develop a disinfection method using environmentally-friendly organic acids.

Key words: Ascidian *Halocynthia roretzi*, *Azumiobodo hoyamushi*, Organic acids, Anti-parasitic effect

우렁쟁이(*Halocynthia roretzi*)는 국내에서 멍게라는 이름으로 널리 알려져 있고 횡감으로 대부분 소비되고 있다. 통계청에 따르면 2009년부터 2014년까지 10,159톤에서 4,999톤까지 생산량의 변화가 심하며 또한 13년도 대비 14년도의 생산량은 35.5톤이 감소한 만큼 연초 질병 발생에 따른 폐사 등으로 나타났다 (Statistics Korea, 2014).

현재 멍게 양식 산업에서 가장 큰 피해가 되고 있는 질병의 원인은 물렁증 (soft tunic syndrome)으로 보고된 바 있다. 이러한 멍게 물렁증의 원인체가 Bodonidae과 (Family Bodonidae)편모충인 *Azumiobodo hoyamushi*라고 보고되었으 (Hirose *et al.*, 2012), 이 물렁증 멍게의 공통적 특징은 피막섬유질다발(tunic fiber bundle)이 붕괴되어 피막이 연화되고 늘어져 특유의 탄력을 잃고 폐사하는 것이다. (Azumi *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2000). 이처럼 물렁증을 유발시키는 편모충은 근래 일본에서 양식중인 멍게에서 연구가 진행되고 있으며(Kumagai

[†]Corresponding author: Kwan Ha Park
Tel: +82-63-469-1885, Fax: +82-63-469-1885
E-mail: khpark@kunsan.ac.kr

et al., 2010), 국내 통영산 멧게에서도 물렁증이 확인되어 일본에서 검출된 편모충과 매우 유사한 형태적 특징을 갖고 있다고 보고되었다 (Shin et al., 2011). 이처럼 멧게 물렁증의 원인충인 *A. hoyamushi*가 우리나라 멧게 양식 산업에 많은 피해를 주기 때문에 원인충에 유효한 약제의 연구가 시급하다.

이전의 연구에서는 *in vitro*와 *in vivo*에서 멧게 물렁증의 원인충인 *A. hoyamushi*에 대해 항생제, 항원충제, 항진균제, 산화제, 할로젠류, 기타 여러 약제들의 노출 효과에 대한 연구가 진행되었다 (Park et al., 2013). 한편 이들 약제보다 환경친화적인 유기산은 예전부터 식품의 부패방지 및 저장기간 증진을 목적으로 사용되어 왔다 (Ricke, 2003). 항진균성 및 항균성 효능을 갖고 있다고 알려진 유기산 (Beuchat and Golden, 1989)의 작용기전은 비해리된 분자가 이온화되어 세포내 pH를 변화시키거나 막투과성을 변경시켜 대사 에너지의 고갈, 영양소 이용을 방해하고 전자 전달 체계에 이상을 준다고 알려져 있다 (Freese et al., 1973).

본 연구는 *in vitro*와 *in vivo*에서 멧게 물렁증의 원인충인 *A. hoyamushi*에 대한 여러 유기산의 노출 효과를 평가하고, 독성시험 후 효과가 높은 유기산을 이용하여 각 농도로 실제 어장에서 유기산이 활용될 수 있는 방안을 연구하였다.

재료 및 방법

시료

본 연구에 사용된 멧게는 전라북도 군산시에 소재해 있는 수산물 판매업체에서 구입하여 사용하였다. 완도수산에 수용되어있던 멧게의 사육온도는 8°C였으며 무게는 평균 70 ± 10 g으로 외관상 건강한 멧게였다. 실험에 사용하게 될 멧게를 Ice-box에 담아 온도를 유지시킨 후 신속하게 실험실로 옮겨 순환여과식 수조의 여과된 해수(30~31 psu)에 넣고, 수온은 15°C로 유지시켜 사육하였다.

A. hoyamushi 배양

멧게의 물렁증을 일으키는 원인체인 *A. hoyamushi*를 물렁증 멧게 피막에서 순수 분리하였다

(Shin et al., 2011). 순수분리 된 *A. hoyamushi*를 MEM배지에 넣고 15°C 인큐베이터에서 배양하였다. 이때 MEM배지는 500ml 증류수에 Eagle's minimal essential medium (MEM, Gibco, USA) 0.47g, fetal bovine serum (Sigma, USA) 12.5ml, sea salt 18g, 200mM L-glutamine (Sigma, USA) 5ml, penicillin (10,000unit)-streptomycin (10mg/ml) solution (Sigma, USA), 1M HEPES buffer solution (Sigma, USA) 2.5 ml를 첨가한 후 0.45µm filter paper를 이용해 여과한 배지에 배양하였다.

시약구입 및 제조

시험에 사용된 유기산은 총 12종으로 모두 *A. hoyamushi*에 대한 살충 효과를 평가하는 데에 사용하였다 (Table 1). 유기산은 Sigma사(USA)에서 citric acid, maleic acid, lactic acid, oxalic acid, palmitic acid, tannic acid, succinic acid, propionic acid, tartaric acid, glycolic acid, malic acid, acetic acid를 구입하여 사용하였고 모든 유기산은 10,000 µg/ml로 제조하여, 시험농도 희석에도 동일하게 MEM을 사용하였고 pH 측정은 pH/ meter (DENVER, Germany)로 측정하였다. 모든 유기산의 순도는 100%로 보정하여 사용하였다.

멧게의 물렁증 유발

건강한 멧게의 물렁증을 유발시키기 위해 순수

Table 1. *In vitro* organic acid used for anti-parasitic efficacy tests

Organic acid	pH at 300 (µg/ml)	Test concentration (µg/ml)
citric acid	4.5	
maleic acid	5.13	
lactic acid	7.3	
oxalic acid	4.58	
palmitic acid	7.1	
tannic acid	7.1	100-1000
succinic acid	4.95	
propionic acid	5.1	
tartaric acid	4.65	
glycollic acid	4.66	
malic acid	4.56	
acetic acid	4.77	

배양된 *A. hoyamushi* 1×10^6 cells/ml을 멍게에 주입하였다. 빠른 물렁증 유발을 위해 20ℓ 수조에 각각 30마리씩 넣고 밀도를 높여 물렁증에 감염된 멍게와 공동사육 하였으며 멍게 물렁증 유발 단계 중 MS (mild symptom)인 Grade 2단계의 멍게를 선정하여 실험에 사용하였다. 이때 물렁증 진단은 Kitamura *et al.* (2010)의 기준에 따라 시각적, 촉각적 방법을 통해 검사하였다.

In vitro에서 *A. hoyamushi* 살충효과

현미경계수법 (Park *et al.*, 2013)으로 12종의 유기산에 대한 살충효과를 확인하기 위해 *A. hoyamushi*(2.5×10^5 cells/ml) 600μl에 시험용액 600μl를 12 well-plate에 넣은 후 1시간 동안 15℃에서 배양한 후 역상현미경으로 200마리씩 무작위로 측정하였다. 생존, 형태이상, 사망으로 구분하여 계수한 후 형태이상과 사망으로 측정된 *A. hoyamushi*의 합을 화합물에 영향을 받은 것으로 계산하였다. 형태이상의 모양은 2가지로 관찰되었는데, 모양은 그대로 움직임이 전혀 없고 표면이 찌그러져있는 상태 또는 세포 내용물이 터져 흘러나온 상태로 관찰되었다. 이러한 형태이상을 나타내는 *A. hoyamushi*를 1시간 동안 추가적으로 배양 후 확인하였을 때 세포 내용물이 밖으로 터져 나와 사망한 것으로 판별 할 수 있었다. 화합물의 평가농도는 MEM배지로 각 100, 150, 200, 250, 300, 500, 1000 μg/ml로 희석하여 평가하였으며 3회 반복하여 1hr-EC₅₀을 도출하였다.

In vivo에서 유기산의 급성독성 평가 및 침투시험

*In vitro*에서 높은 살충효과를 보인 유기산으로 일주일간 실험실내 순환여과수조(15℃)에서 적응시킨 후 건강한 멍게를 이용하여 대조군과 시험군으로 하루에 1시간씩 각 농도별(100~300 μg/ml)로 노출시킨 후 100ℓ 여과 해수에서 사육하며 개체이상 및 사망여부를 관찰하였다. 또한 유기산의 침투력을 확인하기 위해 1시간 노출 직후 멍게 입수공, 몸체 피막을 절개하여 Litmus paper를 이용해 피막내 pH를 측정하였다.

데이터 분석

화합물에 대한 반수영향농도 (median effective concentration, EC₅₀)의 값은 Graphpad Prism (version 5, Prism, USA)을 이용하여 평가하였다.

결 과

In vitro에서 *A. hoyamushi* 살충효과

현미경계수법을 이용한 *A. hoyamushi*의 살충효과에서 12종의 유기산 중 8종에서 300 μg/ml부터 100% 살충력에 가까운 감수성을 나타내었다 (Fig. 1). *A. hoyamushi*에 감수성을 나타낸 유기산은 acetic acid, propionic acid, citric acid, glycolic acid, maleic acid, tartaric acid, malic acid, succinic acid로써 각각 153.3, 200.4, 214.2, 237.1, 257.6, 262.2, 264.9, 275 μg/ml의 1hr-EC₅₀값을 도출하였다 (Fig. 2). 그러나 lactic acid는 시험농도 중 최고농도인 1,000 μg/ml에서 살충효과가 나타나지 않았으며, oxalic acid, palmitic acid, tannic acid는 현미경상 배지의 조성 성분과 혼합된 응집체가 발견되어 계수가 불명확하여 시험하지 못하였다. 이때의 시험농도(300 μg/ml)에서 각 유기산의 pH는 citric acid가 4.5로 가장 낮게 측정 되었다 (Table 1).

In vivo에서 유기산의 독성

*in vitro*에서 세 번째로 높은 살충효과를 보인 citric acid를 선정하였고 (1hr-EC₅₀=214.2), 유기산제제 중 가장 보편화 되어 양식생물에 사용되고 있어

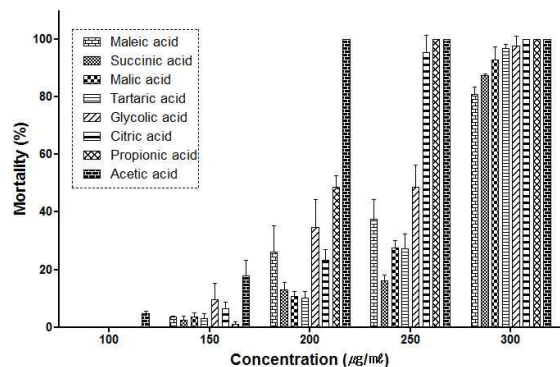


Fig. 1. *In vitro* anti-parasitic efficacy of organic acids at different concentrations. Data are mean ± S.D.

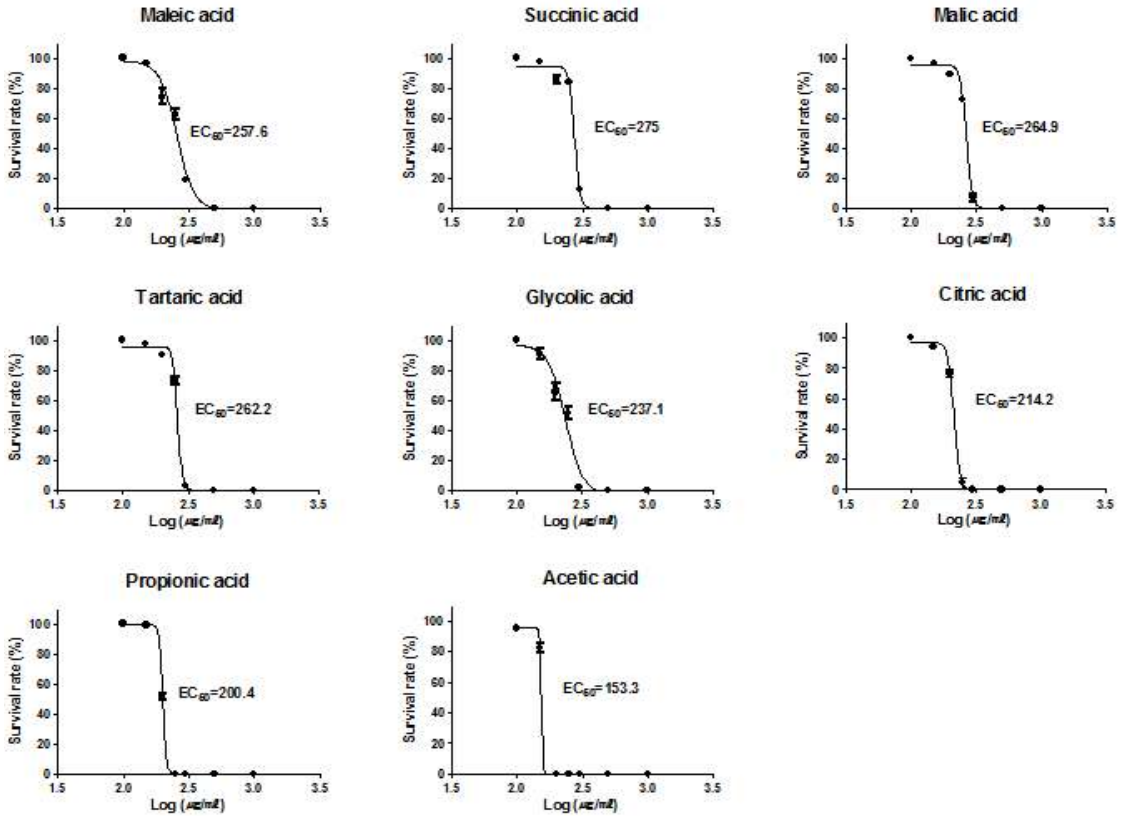


Fig. 2. *In vitro* 1hr-anti-protozoal efficacy of test organic acids. Data are mean ± S.D. ● Microscopic counting.

시험에 사용하였다. 건강한 명게를 이용해 대조군과 시험군으로 하루에 1시간씩 노출 결과 대조군과 100 µg/ml 시험군에서 6.8%, 300, 500 µg/ml 시험군에서는 각각 4.5, 2.7%로 누적사망률이 나타났다. 대조군과 시험군 모두 7일 동안 명게의 누적사망률이 10%이하로 나타나 명게에 대한 독성 영향은 없는 것으로 판단하였다 (Fig. 3). 사망개체의 명게는 2가지 형태로 사망하였으며 피막이 주름이 지면서 말려들어가는 쪼그랑병과 물렁증 형태로 사망하였다.

***In vivo*에서 명게 피막 내 침투력 시험**

*in vitro*에서 독성시험과 동일하게 진행하여 citric acid를 선택하여 시험에 사용하였고, 1시간 노출 후 피막 내 pH를 측정된 결과 500 µg/ml 시험군 명게의 입수공, 몸통 피막은 5~5.5, 300 µg/ml 시험군 명게의 입수공, 몸통 피막은 5.5~6로 측정되었

다. 반면 무처리한 대조군의 명게 입수공 및 몸통 피막은 pH 7~7.5로 측정되었고 500 µg/ml 시험군에서 일부 명게에서 탈색현상이 발생하였지만 1시간 동안 citric acid 처리가 끝난 후 2~3시간 정도가 지

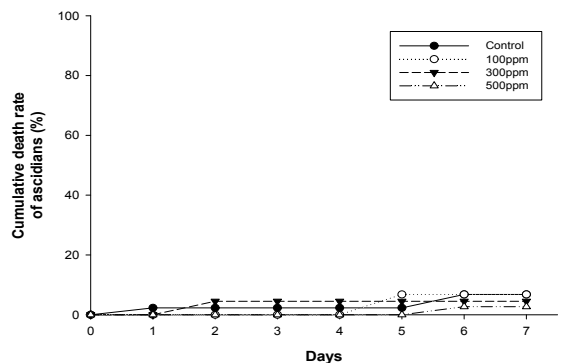


Fig. 3. Toxicity of citric acid to non-infected ascidians (n=11).

나면 명계 본연의 색택을 찾게 되는 것으로 관찰되었다.

고 찰

본 연구에서 사용된 유기산은 항균능, 항진균능을 가지고 있으며 (Beuchat and Golden, 1989) 비해리된 분자가 이온화되어 세포내 pH를 낮추어 각종 미생물과 진균의 활성을 저하시키는 것으로 알려져 (Freese *et al.*, 1973), 이미 많은 연구들이 진행되었다 (Park *et al.*, 2008; Larsen *et al.*, 1993; Rosenquist *et al.*, 1998; Bjornsdottir *et al.*, 2006). 또한 해양에서는 이미 김 활성 처리제로 불법적인 무기산의 남용을 막기 위해 양질의 유기산 처리제 생산 및 시험연구가 활발히 진행 중이며 (Baek, 2007), 이러한 유기산은 미 FDA에서 GRAS(generally recognized as safe)로 허가받은 식품 위생처리제이다 (Ricke, 2003; FDA, 2009). 이처럼 유기산 처리에 의한 세균, 진균제어 효과는 식품에서 보고된 바 있지만 (Jang *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 1999), 명계 물렁증의 원인체인 *A. hoyamushi*와 같은 원충에 대한 약물의 처리 연구는 현재 보고된 바가 없다. 식품에서 각종 미생물의 시험 사례를 참고하여 원충에서의 효과를 예측하고자 시험을 진행하였다.

Park *et al.* (2013)에 의하면 *A. hoyamushi*에 대한 여러 약제 처리 결과 유효약물이 formalin, hydrogen peroxide, bronopol, chlorine dioxide로 나타났으며 이중 chlorine dioxide의 40 $\mu\text{g/ml}$ 단독 투여 시 명계 피막이 탈색이 되는 경향을 보인다고 보고하였다. 유기산 또한 chlorine dioxide와 같이 시험 농도 중 500 $\mu\text{g/ml}$ 이상부터 미약한 명계의 탈색현상이 관찰되었다. Jang *et al.* (2010)에 의하면 메밀 새싹의 상품 유통기간의 연장 및 수확 후 손실을 줄이기 위해 식품첨가물로 사용된 유기산이 일부 농도에서는 조직손상을 유발하여 오히려 미생물 증식이 더 촉진된다고 보고하였다. 이처럼 명계에 유기산을 500 $\mu\text{g/ml}$ 이상 처리할 경우 명계 피막내 pH 저하에 따른 조직손상이 유발되어 일부 탈색이 진행되었다고 생각된다. 하지만 탈색된 명계 피막은 유기산 처리가 종료된 2~3시간 후 명계 본연의 색택을 찾게 되는 것으로 관찰되었다.

순수분리 하여 배양된 편모충의 *in vitro* 시험에서 유기산의 처리농도는 100~1000 $\mu\text{g/ml}$ 로 노출시간은 1시간으로 고정하여 시험하였다 (Park *et al.*, 2013). 12종의 유기산중 oxalic acid, palmitic acid, tannic acid는 여러 응집체들이 발견되어 살충효과를 평가하지 못했지만 나머지 유기산 중 acetic acid와 citric acid의 1hr-EC₅₀이 153.3, 214.2 $\mu\text{g/ml}$ 로 높은 감수성을 나타내었다. pH 또한 다른 유기산보다 낮은 4.77, 4.5 정도로 측정되었다. 유기산의 항균작용은 비해리형 분자의 비율, 세포 대사과정 저해 그리고 pH 저하로 나타낼 수 있다 (Doores, 1993). 유기산의 작용기 중 COOH기는 해리 시 수소이온을 발생시켜 pH 저하를 유발하는 작용기이며 *in vitro* 시험에서 pH가 가장 낮으면서 우수한 살충효과를 나타낸 citric acid를 독성시험과 피막내 침투력 시험의 화합물로 선정 하였다. 또한 Poli *et al.*, (1979)에 의하면 lactic acid와 같이 COOH기를 하나만 가지고 있는 유기산 보다 더 많이 가지고 있는 citric acid와 같은 유기산이 항균효과가 더 우수하다고 보고 하였다.

*in vivo*에서는 순수하게 유기산 처리가 명계에 독성영향을 나타내는지 알아보기 위해 감염되지 않은 명계를 이용하여 citric acid를 하루에 1시간씩 7일간 노출시켜 독성평가를 한 결과 누적사망률이 각 시험농도에서 10% 이하로 나타나 독성이 없는 것으로 판단되었다. 사망개체는 쪼그랑병과 물렁증 증상으로 나타났으며 대조군이 6.8% 누적사망률로 관찰되어, Shin *et al.* (2011) 보고에 따라 이미 통영산 명계의 물렁증 감염이 나타나 아마 독성시험에서의 사망개체도 통영산 명계로 미루어 볼 때 본래의 감염개체가 실험실 내에서 발생한 것으로 판단된다. 또한 100 $\mu\text{g/ml}$ 시험군에서 누적사망률이 대조군과 동일시 나타난 것으로 보아 최소 *in vitro*에서 감수성을 보였던 300 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 처리농도가 필요한 것으로 생각된다.

명계 피막내 유기산의 침투력 시험 결과 *in vitro*에서 *A. hoyamushi*에 100% 살충력이 있었던 pH까지는 측정되지 않았지만, 50% 이상 살충력을 보였던 pH까지는 측정이 되었다. 또한 조직학적으로 물렁증에 감염된 명계 피막을 검사한 결과 피막섬유질다발이 붕괴된 것으로 확인되었고 (Hirose *et*

al., 2009; Kitamura *et al.*, 2010), 통영산 물렁증 멍게 피막 본체 내에서도 편모충으로 의심되는 장축 10~15 μ m, 단축 2~3 μ m의 충체가 확인되었다고 보고하였다 (Shin *et al.*, 2011). 이처럼 *A. hoyamushi*는 피막내에서 기생하므로 피막 깊숙이 침투가 되어야 적절한 효과를 볼 수 있을 거라 생각된다. 따라서 *in vivo*에서 *A. hoyamushi*에 대한 살충효과의 측정이 요구되며, Park *et al.* (2013)이 보고한 *in vitro* 및 *in vivo*에 유효한 formalin, hydrogen peroxide 등의 환원 및 산화제와 추가적으로 병용하여 시험해 볼 필요성이 있다고 생각된다. 또한 각종 식품에서 미생물의 저감을 위해 산화제와 유기산을 단독처리 하는 것 보다 병용하여 처리 시 상승효과를 가져온다고 보고하고 있다 (Veasha *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1999). 따라서 이러한 연구결과를 바탕으로 이들 편모충에 대한 멍게 물렁증에 좀 더 친환경적이면서 효과적인 치료법이 개발될 것으로 기대된다.

요 약

우리나라 멍게 양식의 발전으로 생산량이 점점 증가하였으나 최근 물렁증 (soft tunic syndrome)으로 멍게가 대량 폐사하여 경제적으로 많은 손실을 입고 있다. 이런 물렁증을 일으키는 원인체가 *Azumiobodo hoyamushi*라고 보고되었다. 하지만 이 원인충을 박멸할 수 있는 치료제 연구는 미비한 실정이다. 저자들에 의한 이전의 연구에서 기존의 산화제, 환원제, 소독제 등에서 물렁증에 대한 치료효과가 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 기존의 약제보다 좀 더 친환경적인 유기산을 활용하여 *in vitro* 및 *in vivo* 시험을 통하여 연구하였다. *In vitro* 시험에서 12종의 유기산 중 8종이 300 μ g/ml에서 100% 원충에 대한 살충효과를 발휘하였다. *In vivo*에서의 유기산 침투효과를 평가하기 위해 pH의 변화를 측정된 결과, 유기산 처리 후 멍게 피막내 pH는 *in vitro*에서 보다는 0.5~1 정도 높고 무처리 피막보다는 2.0 정도가 낮아 부분적으로는 침투가 일어남을 확인하였다. 본 연구를 토대로 친환경적인 유기산을 이용하여 물렁증의 치료에 활용할 수 있을 것이다.

References

- Azumi, K., Usami, T., Kamimura, A., Sabau, W.V., Miki, Y., Fujie, M., Jung, S.J., Kitamura, S., Suzuki, S. and Yokosawa, H.: cDNA microarray analyses reveal candidate marker genes for the detection of ascidian disease in Korea. *Zool., Sci.*, 24: 1231-1240, 2007.
- Back J. M.: Prospect of seaweed industry culture. East Asia Food Life SCI., spring symposium, April 2007.
- Beuchat, L.R. and Golden, D.A. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.* 43: 134-142, 1989.
- Bjornsdottir K, Breidt F, McFeeters RF. Protective effects of organic acids on survival of Escherichia coli O157:H7 in acidic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 660-664, 2006.
- Chang S. K., Lee H. H., Hong S. I. and Han Y. S.: Effect of Organic Acid Treatment on the Quality Attributes of Buckwheat Sprout during Storage. *Korean J. FOOD SCI. TECHNOL.*, 42: 190-197, 2010.
- Doores S. Organic acids. in: Antimicrobials in Foods. Branen AL, Davidson PM (eds). Marcel Dekker, Inc., Madison Avenue, NY, USA, pp. 95-124, 1993.
- Food and Drug Administration. Listing of food additive status. Available from: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/default.htm>. Accessed Nov. 2, 2009.
- Freese, E., Sheu, C.W. and Galliers, E. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, 241: 321-325, 1973.
- Hirose, E., Ohtake, S.I. and Azumi, K.: Morphological characterization of the tunic in the edible ascidian, *Halocynthia roretzi*(Drasche), with remarks on 'soft tunic syndrome' in aquaculture. *J. Fish Dis.* 32: 433-445, 2009.
- Hong J. P., Kim Y. S. and Hur S. B.: Effect of Temperature Fluctuation and Different Stocking Densities on Mortality of Sea Squirt, *Halocynthia roretzi* (von Drasche). *J. Aquaculture.*, 13: 285-293, 2000
- Kitamura, S.I., Ohtake, S.I., Song J.Y., Jung, S.J., Oh, M.J., Choi, B.D., Azumi, K., and Hirose, E.: Tunic morphology and viral surveillance in diseased Korean ascidians: soft tunic syndrome in the edible ascidian, *Halocynthia roretzi* (Drasche), in aquaculture. *J. Fish Dis.* 33: 153-160, 2010.
- Kumagai, A., Suto, A., Ito, H., Tanabe, T., Takahashi,

- K., Kamaishi, T., Miwa, S.: Mass mortality of cultured ascidians *Halocynthia roretzi* associated with softening of the tunic and flagellate-like cells. Dis. Aquat. Org. 90: 223-234, 2010.
- Larsen AG, Vogensen FK, Josephsen J. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: Purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. J. Appl. Bacteriol. 75: 113-122, 1993.
- Park K. H., Zeon S. R., Lee J. G., Choi S. H., Shin Y. K. and Park K. I.: *In vitro* and *in vivo* efficacy of drugs against the protozoan parasite *Azumiobodo hoyamushi* that causes soft tunic syndrome in the edible ascidian *Halocynthia roretzi*. J. Fish Dis. 37: 309-317, 2013.
- Park KJ, Lim JH, Kim BK, Kim JC, Jeong JW, Jeong SW. Effect of aqueous chlorine dioxide and citric acid on reduction of *Salmonella typhimurium* on sprouting radish seeds. Korean J. Food Preserv. 15: 754-759, 2008.
- Poli G, Biondi PA, Uberti F, Ponti W, Balsari A, Cantoni C. Virucidal activity of organic acids. Food Chem. 4: 250-258, 1979.
- Ricke SC. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. Poultry Sci. 82: 632-639, 2003.
- Rosenquist H, Hansen A. The antimicrobial effect of organic acids, sour dough and nisin against *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* isolated from wheat bread. J. Appl. Microbiol. 85: 621-631, 1998.
- Shin Y. K., Kim H. J., Park K. I., Choi M. S., Jun J. C. and Kim E. O.: Occurrence of bi-flagellated protists in the tunics of ascidians *Halocynthia roretzi* with tunic-softness syndrome collected from Tongyeong, south coast of Korea. J. fish Pathol., 24: 197-204, 2011.
- Statistics Korea: http://kostat.go.kr/portal/korea/kor_nw/3/index.board, 2014.
- Veasha M Olson, Swaminathan B, Pratt DE, Stadelman WJ. Effect of five cycle rapid freeze-thaw treatment in conjunction with various chemicals for the reduction of *Salmonella typhimurium*. Poultry Sci 60: 1822-1826, 1981.
- Yi C. H., Byun Y. S., Hwang B. W. and Kang H. J.: Efficacy of chlorine and lactic acid for reducing pathogenic and spoilage microorganism on chicken skin. Korean J Vet Serv., 22: 441-418, 1999.

Manuscript Received : September 8, 2015

Revised : October 28, 2015

Accepted : December 10, 2015