J. Fd Hyg. Safety 10(4), 205 - 211(1995)

인산염이 *Listeria monocytogenes* Scott A 성장에 미치는 영향

송재영 · 김일환* · 정덕화0†
*경상대학교 식품공학과, *(주)서도화학*

Effect of Polyphosphates on the Growth of *Listeria monocytogenes* Scott A

Jae-Young Song, Il-Hwan Kim* and Duck-Hwa Chung
*Department of Food Science & Tech., Gyeongsang National University, Chinju, 660-701, *Seo-Do Chemical Co.*

ABSTRACT — To investigate the antimicrobial effect of polyphosphates as a food additive, the growth and structural change of *Listeria monocytogenes* Scott A were examined in relation to polyphosphates concentration and incubation temperature. Up to 10,000 ppm of polyphosphates, the growth rate of strain was gradually inhibited with increasing polyphosphates concentration and decreasing the incubation temperature. Minimal inhibitory concentration of polyphosphates to the growth of strain was about 12,000 ppm. It was observed , using both scanning electron microscopy(SEM) and transmission electron microscopy(TEM), that 0.9% polyphosphates treatment was resulted in the destruction of cell wall and outflow of cell ingredients. The antimicrobial effects of polyphosphates were more effective than those of dehydroacetate and potassium sorbate at 13°C and 4°C. The growth rate of the strain in beef was significantly inhibited by the treatment of 0.9% polyphosphates and storaged at cooling temperature.

Key words □ *Listeria monocytogenes* Scott A, Polyphosphates, Minimal inhibitory concentration

식중독의 원인균으로 알려진 *L. monocytogenes* Scott A는 식물, 토 양, 표층수 등 자연계에 널리 분포되어 있으면서 오염 증식되어 목초, 하수, 도축장 폐수, 건강한 젖소와 유선염 젖소의 우유, 사람이나 동물의 분변 및 소, 양, 가금류의 소화기관에 널리 분포되어 리스테리아증(listeriosis)의 주 원인균으로 우리 일상생활과 밀접한 관계가 있는 병원균이다.[1,2] 이균의 주요 감염경로는 오염된 야채, 가공 낙농식품, 육고기 등의 섭취로 인한 감염[3,4]과 오염된 토양, 폐하수, 동물의 분변, 수의사나 가축 취급자의 감염[5,6] 등에 의하여 감염된다. 균에 대한 감수성은 임산부 노약자, 면역결핍자, 면역저하자들이 높으며 사람에게는 주로 패혈증, 수막염, 유산[7,8] 등을 일으키고 또한 동물에서도 주로 뇌염, 패혈증, 유산 등을 일으킨다.[9,10] 리스테리아증이 오늘날 전세계적으로 주목을 받고 있는 이유는 다양한 식품에서의 발병과 균분리 및 높은 치사율과 낮은 온도와 높은 온도에서 생육이 가능하며, pH 4.5에서도 생육이 가능하고 저온저장 식품과 산도가 높은 식품에서도 이 균에 의한 병의 발생위험이 상존하기 때문이다.[11] 식품의 안정성을 유지하면서 효과적으로 성장을 저해하려는 많은 연구가 행해져 왔다. 즉, 모델 밀크 시스템에서의 phenolic compounds 항균효과,[12] 우유와 EHI 배지에서 fatty acids와 monoglyceride의 항균효과,[13] 발효소세지의 제조과정에서 nitrite/nitrate의 항균효과,[14] 배지상에서 acetic acid, lactic acid, citric acid의 첨가에 의한 생육저해 효과[15] 등이 발표되었다. 인산염을 배지나 육고기 등의 식품에 첨가하였을 경우 일어나는 주요 화학적인 기작은 pH 감소, 금속이온의 해리 및 다가 음이온이 존재하는 용액중 이온강도의 증가[16]등으로 인해 항균 효과가 있는 것으로 추정되고 있으며 냉장식품에서 인산염이 세균의 성장에 미치는 영향,[17] 인산염을 이용한 *Clostridium botulinum*의 항균효과[18] 등이 보고 되었으며 현재 다양한 종류의 인산염들이 식품의 제조용제로서 광범위하게 사용되고 있으며 특히 육고기 제품의 경우 함습제, 산패방지제, 유화제, 발색제 및 안정제 등의 용

† To whom correspondence should be adressed.

도로 사용되고 있다.[19] 따라서 본연구는 새로 개발된 인산염을 이용하여 *L. monocytogenes* Scott A의 생장에 미치는 영향과 형태학적, 세포학적 변화를 전자현미경으로 관찰하고, 또한 식중독 예방의 일환으로 쇠고기에 인산염을 처리하여 이 공시균의 생육저해에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주및 배지

본 실험에서 인산염의 항균효과를 알아보기 위한 균주는 경상대학교 수의과대학 수의미생물학 연구실로부터 분양받은 *Listeria monocytogenes* Scott A를 사용하였고 Mcbride Listeria agar(Difco Lab.) 사면배지에 매달 계대배양하면서 4°C에 보관하였다. 전배양액은 Brain Heart Infusion Broth(Difco Lab.)에 접종하여 37°C에서 18시간 진탕배양한 후 균수를 2.5×10^3 CFU/m*l*로 조절하여 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 인산염의 항균효과 실험에서는 Freser Base Broth(FBB, Difco Lab.)를 사용하였다. 균수 측정은 nutrient agar(Difco Lab.)에 100 μ*l* 도말하여 37°C 항온기에 배양시 나타나는 colony 수로서 계산하였으며, 본 실험에 사용된 인산염은 (주)서도화학에서 개발한 제품으로 sodium acid phosphate의 물질로서 산성영역의 $(NaPO_3)n$의 기본적인 화학식을 가지며 n=11 이상의 농축화학물로서, 화학적 특성으로 1% 용액의 pH는 1.8~2.2이고 P_2O_5 함량이 70% 이상이며 분자량이 1121.57로서 물에 비교적 잘 녹지 않는 난용성 물질이다. 이 물질은 cyclic phosphate가 아닌 polymer phosphates로서 polymeta형의 혼합물인 특수인산염이다.

배양조건

실험에 사용한 모든 배지의 pH는 pH meter(DMS, Korea)로 측정하였으며 각 농도별로 인산염을 첨가하기 전과 후, dehydroacetate와 potassium sorbate를 첨가한 후 배지의 pH를 측정하여 pH 변화에 따른 실험균주의 생육정도를 측정하였으며, *in vitro* test에서는 각 온도별로 *L. monocytogenes* Scott A에 대한 인산염의 항균효과를 알아보기 위하여 전배양액 100 μ*l*를 접종한 후 4°C(냉장 온도), 13°C (운송 온도), 및 37°C(최적 배양 온도)에서 7일간 배양하여 나타난 저해정도를 측정하였다.

L. monocytogenes Scott A에 대한 polyphosphates의 최소저해농도

실험균주에 대한 polyphosphates의 최소저해농도를 알아보기 위하여 멸균한 Fraser base broth 8 m*l*에 전배양액 1 m*l*(2.5×10^3 CFU/m*l*)와 희석 조제한 인산염을 0, 2,500, 5,000, 7,000, 9,000, 10,000, 12,000, 15,000 ppm의 농도별로 첨가한 후 생육최적온도인 37°C에서 배양한 후 멸균수로 단계별 희석하여 nutrient agar에 도말하고 37°C에서 48시간 배양하여 형성된 균체집락의 수를 측정하였으며, 이때 48시간 배양 후 성장되지 않는 농도를 최소저해농도로 하였다.

인산염의 농도, 배양시간, 및 배양온도에 따른 항균효과 측정

실험균주에 대한 polyphosphates의 농도, 배양시간 및 배양온도에 따른 항균효과를 알아보기 위하여, Freser base broth 100 m*l*와 인산염을 0, 0.25, 0.5, 0.75 및 0.90%로 첨가한 삼각 플라스크에 실험균주 전배양액을 접종하여 4°C, 13°C 및 37°C에서 7일간 진탕배양하면서 매 24시간마다 배양액 200 μ*l*를 microtiter에 loading하여 ELISA Reader로 570 및 630 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 또한 집락수는 매 24시간마다 배양액 100 m*l*를 멸균수로 단계적 희석하여 nutrient agar에 도말하고 37°C에서 48시간 이후에 나타난 집락 수로 계산하였다.

전자현미경에 의한 세포형태의 변화관찰

Polyphosphates가 *L. monocytogenes* Scott A에 대하여 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 실험균주와 0.5 및 0.9%의 인산염이 첨가된 Fraser base broth를 37°C에서 48시간 배양한 다음 배양액 1 m*l*를 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 주사형전자현미경(Scanning Eletron Microscope, SEM)으로 세포의 변화를 관찰하기 위하여 회수한 균체 1 m*l*에 4% NBP를 가하여 2회 세척한 후 다시 4% NBP용액을 가하여 4°C에서 48시간 동안 고정한 후 0.015 M PBS로 세척하고 무수알코올 상승순(30~100%)으로 20분씩 진탕, 탈수하고 임계점 건조기로 건조한 후 형태변화를 관찰하였으며, 투과형 전자현미경(Transmission Electron Microscope, TEM)에 의한 균체 내부의 관찰은 회수된 실험 균체에 2.5%의 glutaraldehyde를 가하여 진탕, 고정하고 다시 osmium tetraoxide 용액(4%, pH 7.0)으로 후고정하고 0.2 M 인산완충용액(pH 7.0)으로 수세한 후 무수알콜 상승순으로 실온에서 20분간 탈수하였다. Propylene oxide로 30분간 2회 처리하여 치환한 후 Epon 화합물로 포매한 후 37°C electron microcsope oven에서 12시간, 45°C에서 48시간동안 열중합하고 LKB-V형 ultramicrotome으로 0.5~2.0 μm 두께로 semithin section를 제작하고 toludine blue로 단염색하여 관찰 대상 범위를 확인한 후 은색절편을 제작, copper grid (200 mesh)에 흡착한 다음 1% uranyle acetate와 lead citrate를 사용하여 이중염색하여 검경하였다.

식품보존제와의 항균작용 비교 실험

식품보존제로서 항균작용을 가지고 있는 것으로 알려진 dehydroacetate와 potassium sorbate를 본 실험에 사용한 polyphosphate(n=11)와의 항균작용을 비교하기위하여, Fraser base broth에 위의 세 화합물을 각각 0, 0.25, 및 0.5%의 농도로 첨가한 후 시험균주 전배양액을 접종하고 37°C, 13°C 및 4°C에서 7일간 배양하면서 흡광도와 생균수 측정을 비교하였다.

인산염을 이용한 소고기에서의 항균효과

소고기에 대한 식품보존료로서의 항균효과를 알아보기 위하여 Miolins 등의 방법[20]으로 실험을 행하였다. 즉, 신선하게 냉동 보관된 쇠고기를 균질기로 마쇄한 쇠고기 분말, 인산염 분말과 *L. monocytogenes* Scott A의 전배양액을 polyethylene bag에 넣어 혼합한 후 4°C에서 7일 동안 보존하면서 48시간마다 시료를 채취하여 0.5% peptone water로 단계적으로 희석하여 nutrient agar에 도말한 후 형성된 colony수를 측정하였다.

결과 및 고찰

인산염의 최소 저해 농도

L. monocytogenes Scott A에 대한 polyphosphates의 최소저해농도를 알아보기 위하여 인산염 농도를 5,000, 7,000, 9,000 및 10,000 ppm되게 첨가한 배지에서 배양하였다. 균주는 시간이 지남에 따라서 성장이 저해되어 배양 48시간 후에는 각각 1.8×10^6, 1.3×10^6, 1.0×10^6, 5.3×10^4 및 3.8×10^3 CFU/m*l*로 나타났으나, 12,000 rpm 이상의 인산염 처리시에는 12시간 후 생육이 급격히 저하하고 배양 48시간 이후에는 완전히 사멸되는 것으로 보아 실험균주에 대한 인산염의 최소저해농도는 12,000 ppm인 것으로 추정하였다(Fig. 1).

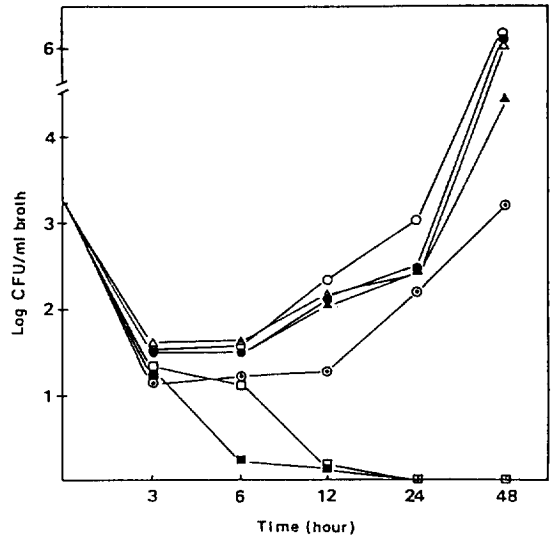

Fig. 1. Distribution of MIC(minimum inhibitory concentration) of polyphosphates to *Listeria monocytogenes* Sott A.
○: 5,000, ●: 7,000, △: 8,000, ▲: 9,000, ◉: 10,000, □: 12,000, ■: 15,000, (Unit: ppm)

인산염의 항균효과

최소저해농도와 법정허용치를 근거로 하여 인산염을 첨가하지 않은 대조구와 농도별로 첨가한 처리구의 온도를 달리하였을 때 나타난 결과는 Fig. 2와 같았다. 즉, 실험균주의 최적배양온도인 37°C에서 배양한 경우는 대조구에서 배양 168시간 후 9.3×10^{10} CFU/m*l*로 나타난 반면, 0.25, 0.5, 0.75 및 0.9%의 인산염 처리시에는 8.0×10^7, 3.0×10^6, 1.2×10^5 및 2.0×10^4 CFU/m*l*로 나타나, 시간의 경과에 따라 대조구에서는 균의 증식이 표준증식곡선과 비슷한 양상을 나타내어 인산염의 농도가 증가 할수록 lag phase가 지연되어 균의 증식도 억제되는 것을 알 수 있었다. 육류식품의 수송온도인 13°C에서 인산염의 효과는, 배양 168시간 후 대조구는 2.2×10^8 CFU/m*l*로 나타났으나 인산염이 0.25, 0.5, 0.75 및 0.9%로 첨가된 구에서는 1.8×10^6, 2.3×10^5, 2.0×10^4 및 3.0×10^3 CFU/m*l*로 나타나 37°C에서 배양한 균주에 비하여 lag phase가 더욱 지연됨과 동시에 균 생육 억제도 많이 일어나는 것을 알 수 있었다. 식품의 냉장보관 온도인 4°C에서의 인산염의 저해효과는 대조구의 경우 배양 7일 후에 8.0×10^6 CFU/m*l*이었으며, 0.9%인산염 처리시 2.03×10^3 CFU/m*l*로 나타나 인산염의 증가와 온도저하에 의하여 *L. monocytogenes* Scott A의 생육이 크게 저해되는 것을 알 수 있었다.

전자현미경에 의한 세포 관찰

인산염이 *L. monocytogenes* Scott A의 균체에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 0.5%와 0.9%의 인산염으로 처리한 것과 처리하지 않은 대조구의 세포를 배양하여 실험방법에 따라서 조제한 전자현미경 시료를 검경한 결과는 Fig. 3 및 Fig. 4와 같았다. 그 결과, 주사형 전자현미경(SEM)관찰에서는 0.5% 인산염을 처리한 경우 균체의 세포벽이 크게 영향을 받지 않았으나, 0.9% 인산염을 처리시에는 균체의 세포벽이 파괴되어 외형이 변화되는 것을 알 수가 있었다. 투사형 전자현미경(TEM)의 관찰에서는

SEM의 결과와 동일하게 0.5%의 인산염 처리시에는 세포에 크게 영향을 미치지 않았지만, 인산염 0.9%의 처리시에는 세포막의 기능이 파괴되어 세포 내용물이 용출되고 대조구와 비교하여 균주의 개체수가 작은 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 실험균주의 세포벽과 세포내 물질에 인산염이 크게 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 이것은 항균제의 경우 주로 작용부위가 세포벽이므로 항균

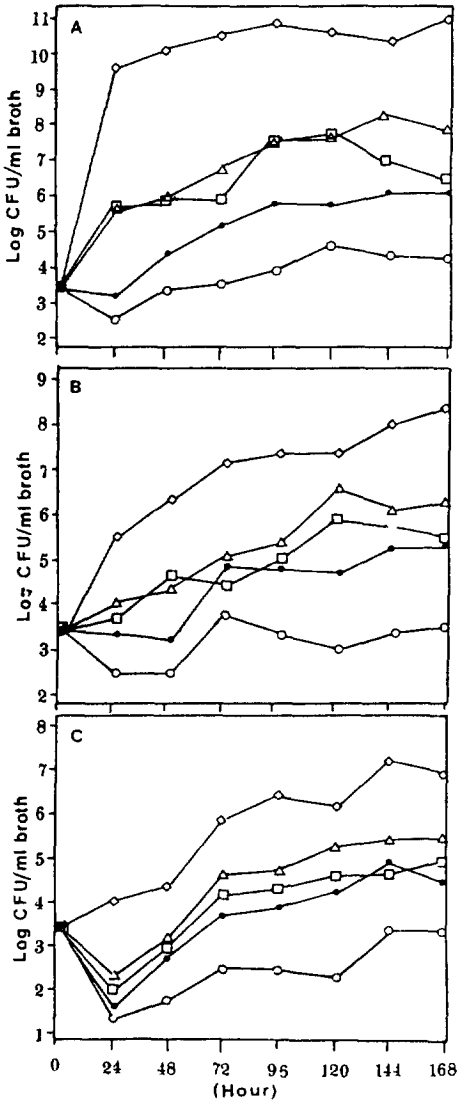

Fig. 2. Inhibitory effect of polyphosphates on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at different temperature.

Temperature; A: 37℃, B: 13℃ C: 4℃, Concentration of polyphosphates: ◇: control, △: 0.25%, □: 0.5%, ●: 0.75%, ○: 0.

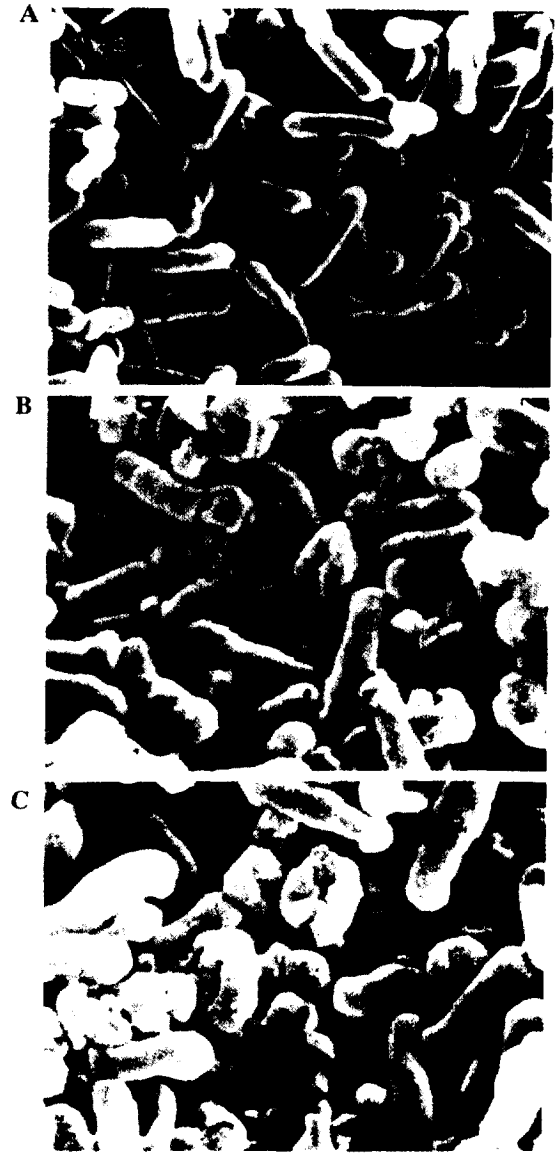

Fig. 3. Scanning electron micrographs of *Listeria monocytogenes* Scott A.

A: Control (Magnification; ×15,000)

B: Treated with polyphosphates(0.5%)

C: Treated with polyphosphates(0.9%)

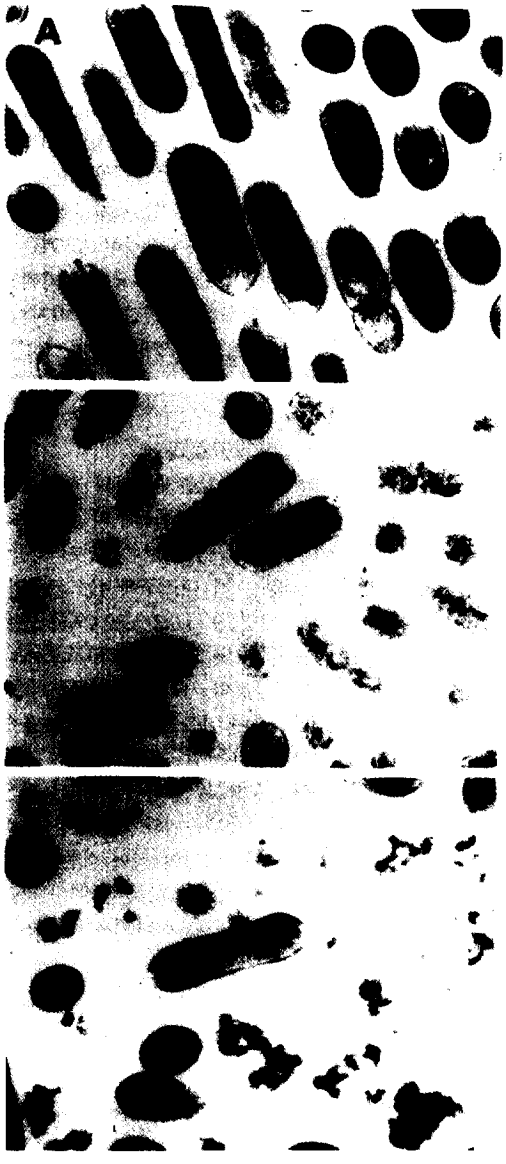

Fig. 4. Transmission electron micrographs of *Listeria monocytogenes* Scott A. (Magnification; ×25,000)

A: Control

B: Treated with 0.5% of polyphosphates

C: Treated with 0.9% of polyphosphates

제를 처리한 균주들은 세포벽이 파괴되어 세포내 물질이 세포밖으로 용출되어 나와서 균주가 사멸한다는 연구보고[16]와 같이 인산염의 항균작용도 또한 세포벽이 파괴되어 세포내 물질이 소실되는 것을 알 수 있었다.

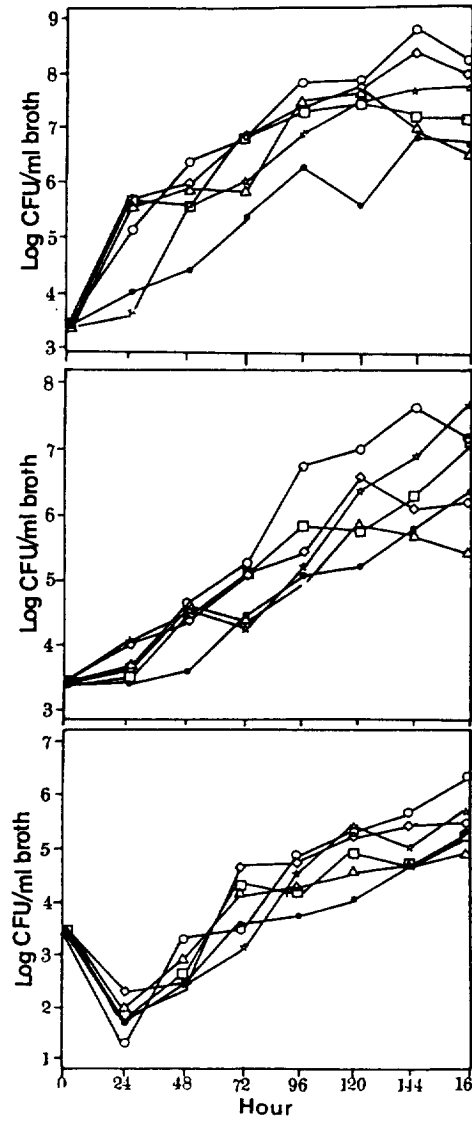

Fig. 5. Effects of polyphosphates, dehydroacetate and potassium sorbate on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at different temperature.

Temperature; A: 37°C, B: 13°C, C: 4°C, Concentration: polyphosphates: ◇: 0.25, △: 0.5%, dehydroacetate: □: 0.25%, ●: 0.5%, potassium acetate: ○: 0.25%, ☆: 0.5%.

항균작용의 비교실험

인산염과 기존의 식품보존제인 dehydroacetate 및 potassium sorbate의 항균작용을 비교함으로써 인산염이 식품보존제로서 적합한지를 알아보기 위하여 *L. monocytogenes*

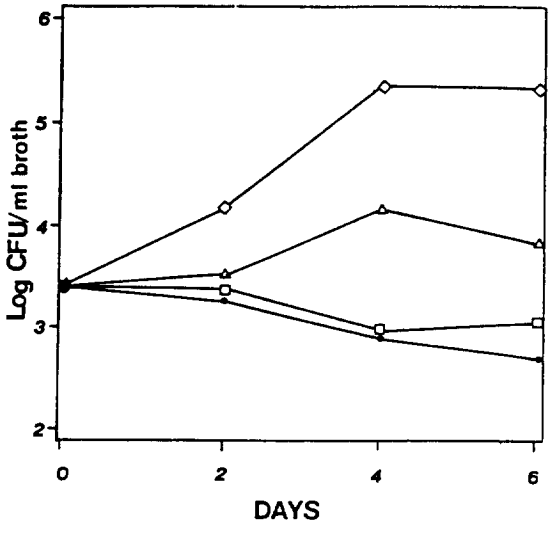

Fig. 6. Effects of polyphosphates on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A in beef during storage at 4°C in polyethylene film.

The concentration of polyphosphates; ◇—◇: 0%, △—△: 0.1%, □—□: 0.2%, ●—●: 0.4%.

Scott A의 생육저해에 미치는 영향은 Fig. 5에 나타나 있다. 그 결과, 생육최적온도인 37°C에서 0.25 및 0.5%의 인산염, dehydroacetate와 potassium sorbate를 처리하였을 경우 배양 7일 후에 균수가 8.0×10^7, 3.0×10^6, 1.3×10^7, 4.0×10^6, 1.3×10^8 및 5.3×10^7 CFU/m*l*로 나타나 polyphosphates의 항균 능력이 dehydroacetate보다 조금 낮았지만 potassium sorbate보다는 항균력이 큰 것을 알 수가 있었다. 수송온도인 13°에서의 이들 화합물의 처리효과는 1.8×10^6, 2.3×10^5, 1.4×10^7, 2.4×10^6, 1.3×10^7 및 4.8×10^6 CFU/m*l*로 나타났으며 사용된 화합물의 항균 능력이 비슷한 것을 알 수 있었다. 반면에 4°C의 냉장보관 온도에서의 영향은 배양 168시간 후에 2.2×10^6, 8.0×10^4, 1.7×10^6, 1.9×10^5, 2.1×10^6 및 4.3×10^5 CFU/m*l*로 나타났다. 위의 결과로 미루어 볼때 인산염은 4°C 처리시에서 볼 수 있는 것처럼 온도가 저하할수록 기존의 식품보존제보다 항균력이 증가하는 것을 알 수가 있었다. 특히 저온에서 균의 생육이 저해하는 것은 온도저하에 의한 균의 불활성화, 인산염이 배지의 무기영양물질을 킬레이트화시킴으로서 영양물질의 고갈[16]에 의한 것으로 사료되었다.

인산염을 처리한 소고기의 항균효과

쇠고기에 대한 인산염을 식품보존제로서의 항균효과를 알아보기 위하여 신선한 쇠고기에 실험균주의 전배양액과 인산염을 처리하여 4°C에서 7일 동안 보존하면서 항균 효과를 검사한 결과 7일 배양 후에 대조구에서는 균수가 2.1×10^5 CFU/m*l*로 나타난 반면, 0.1, 0.2 및 0.4%의 인산염 처리시에는 6.6×10^3, 1.2×10^3 및 5.0×10^2 CFU/m*l*로 나타났다(Fig. 6). 이와 같이 인산염의 처리시 실험균주의 생육저지 및 사멸을 볼 수 있었으며 인산염의 농도가 높을수록 영향이 두드러지게 나타나는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 본 실험에 사용된 인산염(polyphosphates)은 기존의 식품보존제와 항균작용이 비슷할 뿐만 아니라 인체에 미치는 영향이 적어 식품제조용제로 뿐만 아니라 보존제로 활용될 수 있어 식품이나 사료에서의 활용에 대한 다양한 연구가 필요하다고 사료된다.

국문요약

인산염이 *L. monocytogenes* Scott A의 생육과 세포형태 변화에 미치는 영향을 배양온도와 농도를 달리하여 조사하였다. 10,000 ppm 이상의 인산염을 첨가하였을 때는 배양온도가 낮고 인산염의 농도가 증가할수록 균의 생육이 억제되었으며, 인산염에 대한 균의 생육최소저해농도는 12,000 ppm이었다. 실험균주에 0.9%의 인산염을 첨가하여 배양한 후 주사형 및 투과형 전자현미경의 검경에서 세포벽의 파괴와 세포 내용물의 세포외 용출이 관찰되었다. 한편, 다른 식품보존제와의 항균실험에서는 인산염이 저온(13°C와 4°C)에서 dehydroacetate와 potassium sorbate보다 높은 균의 생육저해효과를 나타내었으며, 4°C에서 0.9%의 인산염을 쇠고기에 처리한 항균효과 실험에서는 대조구에 비하여 현저한 균생육의 저해가 있었다.

참고문헌

1. Bojsen-Moller, J.: Humun listeriosis. Diagnostic, epidemiological and clinical studies. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **229**, 72-155 (1972).

2. Dutta, P.K. and Malik. B.S.: Isolation and charact-

erization of Listeria monocytogenes from animal and human being Indians. *J. Anim. Sci.*, **51**, 1045-1051 (1981).

3. Schlech, W.F., P.M. Lavigne, R.A. Bortolussi, A.C. Allen, E.V. Haldane, A.J. Wort, A.W. Higtorwer, S.E. Johnson, S.H. King, E.S. Nicholls, and Broome, C.V.: Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.*, **308**, 203-206 (1983).
4. Ralovich, B.: Listeriosis research-present situation and perspective. Akademiaikiado. Budapest. 5. Nieman, R.E. and Lorber, B. Listeriosis in adult: A changing pattern. Report of eight cases and review of the literature., *Rev. Inf. Dis.*, **2**, 207-227 (1984).
5. Gray, M.L.: Listeriosis in fowls-A review. *Avian Dis.*, **2**, 296-314 (1958).
6. Azaiian, B.S., G.T. Finnerty, and Pearson, A.D.: Cheeseborne *Listeria meningitis* in immunocompetent patient. *Lancet.*, **1**, 322-323 (1989).
7. Elmer, H.M.: Kisease characteristics of *Listeria monocytogenes. Food Technol. Overview.*, **1**, 62 (1988).
8. Anonymous.: Listeriosis. *Lancet.*, **2**, 364-365 (1985).
9. Low, J.C and Renton, C.P.: Septicemia, encephalitis and abortions in a housed flock of sheep caused by *Listeria monocytogense* type 1/2.vet. Rec. **116**, 147-150 (1985).
10. Blenden, D,C., and Szatlowiz, F.T.: Ecologic aspects of listeriosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **151**, 1761-1766 (1967).
11. Parish, M.E., and Stringer, M.F.: Survial of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth system. *J. Food Prot.*, **52**, 144-147 (1989).
12. Kim. Payne, Emilia Rico-Munoz, and Davidson, P.M.: The antimicrobial activity of phenolic compounds agaimot *Listeria monocytogenes* in a model milk system. *J. Food Prot.*, **52**, 151-153 (1989).
13. Wang, L.L. and Jonnson, E.A.: Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Fatty Acid and Monoglyceride. *Applied and Enviorn. Microbiol.*, **2**, 642-629 (1992).
14. Laura J., P. Hill and Nurimi, E.: Effect of differnt levels of nitite and nitrite on the survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of fermanted sausage. *J. Food Prot.*, **52**, 158-161 (1989).
15. Normah Ahamad and Elmer H.M.: Behavior of 7, 13, 21 and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric, or lactric acid. *J. Food Prot.*, **52**, 688-695 (1989).
16. Molins, R.A. *et al.*: Effects of poly- and pyro-phosphates on the natural bacterial flora and inoculated *C. sporogenes* PA3679 in cooked vacuum packaged bratwurst. *J. Food. Sci.*, **50**, 876-880 (1985).
17. Junttila, J.R., I. Niemale and Hirn, J.: Minimum growth temperature of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria. J. Appl. Bacteriol.*, **65**, 321-327 (1988).
18. Barbut, S.N. *et al.*: Effects of sodium chloride reduction and polyphosphate addition on *Clostridium botulinum* toxin production in turkey Frankfurters. *J. Food Sci.*, **51**, 1136-1138 (1986).
19. Madril, M.T. and Sofos, J.N.: Interaction of reducd NaCl, sodium acid pyrophosphate and pH on the antimicrobial activity of comminuted meat products. *J. Food Sci.*, **51**, 1147-1151 (1986).
20. Molins, R.A., A.A. Kraft and Olson, D.G.: Effect of phosphates on bacterial growth in refrigerated uncooked bratwurst. *J. Food Sci.*, **50**, 531-535 (1986).