

Sonderdruck aus der

Verpackungs-Rundschau

Literaturhinweis: Verpackungs-Rundschau **22** (1971) Nr. 8, Techn.-wiss. Beilage, Seiten 70-72

Merkblätter für die Prüfung von Packmitteln

Merkblatt 9

Merkblätter für die Prüfung von Packmitteln

Herausgegeben von den Arbeitsgruppen des Instituts für Lebensmitteltechnologie und Verpackung an der Technischen Universität München

Merkblatt 9

Prüfung von Wellpappe — Bestimmung der Anzahl von Schimmelpilzen auf der Oberfläche von Wellpappe und auf Wellenpapieren aus fertiger Wellpappe

Herausgegeben von der Untergruppe „Oberflächenkeimzahlbestimmung“ der Arbeitsgruppe „Lebensmittelerhaltung und Mikrobiologie“ — Juni 1971*

1. Zweck und Anwendung

Dieses Merkblatt beschreibt ein Prüfverfahren zur Bestimmung der Anzahl von Schimmelpilzen auf der Oberfläche von Wellpappe und auf Wellenpapieren aus fertiger Wellpappe.

2. Begriff

Die Oberflächenkeimzahl (OKZ_s) gibt die Anzahl der Schimmelpilze an, die nach einer Bebrütungszeit von drei Tagen bei einer Temperatur von 25 °C auf 100 cm² der zu untersuchenden Wellpappe oder des zu untersuchenden Wellenpapiers gefunden werden.

3. Probenahme, Probenanzahl

- 3.1 Die Probenahme erfolgt nach DIN 53 101. Die Proben sind so zu entnehmen, daß nur die Ränder der Proben angefaßt werden. Die entnommenen Proben sind sofort aufeinander und in ein sterilisiertes Probenahmegefäß zu legen.
- 3.2 Die Probenanzahl soll pro Entnahmeeinheit mindestens 10 Stück betragen.

4. Prüfgeräte

- 4.1 Brutschrank, regelbar auf eine Temperatur von 25 °C ± 1 grad. (diese Temperatur muß an allen Stellen im Brutraum gleichmäßig eingehalten werden).
- 4.2 Autoklav für einen Betriebsdruck bis 3,5 bar und eine Sterilisationstemperatur bis 134 °C. Er muß so eingerichtet sein, daß eine Mindesttemperatur von 120 °C ± 2 grad. eingehalten werden kann.
- 4.3 Dampftopf
- 4.4 Heißluftsterilisator für eine Sterilisationstemperatur von 160 bis 170 °C.

- 4.5 Kolonienzählgerät; es ist zur Arbeitserleichterung zweckmäßig, nach Möglichkeit ein Kolonienzählgerät zu verwenden, das mit einer elektrischen Zählleinrichtung und mit einer Lupe von 8–10facher Vergrößerung versehen ist.
- 4.6 Petrischalen aus Glas nach DIN 12 339 bzw. sterile Einweg-Petrischalen aus Kunststoff, Durchmesser von 90–94 mm.
- 4.7 Messer, Papiermesser, sterilisierbar
- 4.8 Pinzetten oder Kornklammern
- 4.9 Bunsenbrenner oder Spirituslampe
- 4.10 Sterilisierbare Metallschablone, 6 x 6 cm
- 4.11 Sterilisierbarer Kreisschneider, 50 cm²
- 4.12 Gipsschere oder eine ähnlich starke Schere aus nichtrostendem Stahl
- 4.13 Becherglas, DIN 23 312, 2 l
- 4.14 Glasstab, Länge 30 cm, ϕ 0,5 cm
- 4.15 Nährbodenflaschen, 300 ml mit Kapsenbergkappen oder passenden Zellstoffstopfen
- 4.16 Rollrandflaschen mit Bügelverschluß, 250 ml
- 4.17 Zentimetermaß

5. Nährmedium und Hilfslösung

- 5.1 Schimmelpilznährboden
- 5.1.1 Zusammensetzung
5 g Pepton aus Casein, tryptisch verdaut,
5 g Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut,
10 g D (+)-Glucose, C₆H₁₂O₆ · H₂O,
10 g Maltose, C₁₂H₂₂O₁₁ · H₂O,
10 g – 15 g Agar-Agar pulv.
(Festlegung der Menge je nach den Eigenschaften des Agar-Agar),
1000 ml Wasser.
- 5.1.2 Bereitung

Die angegebenen Mengen Nährstoffe werden einem Liter frisch destilliertem oder voll entsalztem Wasser — das sich in einem 2-l-Becherglas befindet — zugesetzt, unter ausgiebigem Umrühren gleichmäßig verteilt, bis zur Lösung gekocht und in vier 300-ml-Nährbodenflaschen umgefüllt. Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven 15 Minuten bei 120 °C. Der pH-Wert des fertigen Nährbodens soll bei 20 °C 5,6 ± 0,1 betragen. Der Nährboden muß bei 48 °C ± 2 grad. gießbar sein.

* Die Untergruppe „Oberflächenkeimzahlbestimmung“ hat bisher in Zusammenarbeit mit dem Verein der Zellstoff- und Papier-Chemiker und Ingenieure (Zellcheming), Fachausschuß für Pappenerzeugung folgende beiden Merkblätter erarbeitet:
Zellcheming-Merkblatt VIII/3/68: Prüfung von Papier, Karton und Pappe — Bestimmung der Anzahl von Schimmelpilzen auf der Oberfläche von Karton, Vollpappe und Wellpappenrohpapieren (Oberflächenkeimzahl, OKZ_s);
Zellcheming-Merkblatt VIII/4/68: Prüfung von Papier, Karton und Pappe — Bestimmung der Gesamtkeimzahl (GKZ) in Papier, Karton und Vollpappe.
Das vorliegende Merkblatt 9 schließt sich diesen beiden Merkblättern an.

pH-Wert-Einstellung:

Wird der angegebene pH-Wert von $5,6 \pm 0,1$ nicht erreicht, muß der Nährboden auf diesen Wert eingestellt werden. Dies geschieht am besten mit steriler 0,1 n Salzsäure oder Natronlauge. Die pH-Wert-Kontrolle erfolgt elektrometrisch.

5.2 Hilfslösung

5.2.1 Zusammensetzung

2,250 g Natriumchlorid,
0,105 g Kaliumchlorid,
0,120 g Calciumchlorid,
0,050 g Natriumhydrogencarbonat,
0,010 g Tween 80.

5.2.2 Bereitung

Die angegebenen Chemikalienmengen werden in 100 ml frisch destilliertem oder voll entsalztem Wasser gelöst und in 250-ml-Rollrandflaschen mit Bügelverschluß gegeben. Die Sterilisation erfolgt mit offenem Bügelverschluß im Autoklaven 15 Minuten bei 120°C (es kann auch nach der Membran-Filter-Methode sterilisiert werden).

6. Durchführung der Prüfung

6.1 Sterilisation

Pinzetten, Messer, Schere, Kreisschneider, Schablone und Glaspetrischalen nach DIN 12 339 sind im Heißluftsterilisateur 2 h lang bei mindestens 160°C zu sterilisieren. Bei Serienanalysen können Pinzetten, Messer, Schere, Kreisschneider und Schablone auch durch Abflammen sterilisiert werden.

6.2 Versuchsstückvorbereitung

Aus den Proben werden mit einem sterilen Messer oder einer sterilen Schere mit Hilfe der sterilen Schablone Versuchsstücke der Größe $6 \times 6 \text{ cm}$ oder mit dem sterilen Kreisschneider Versuchsstücke der Größe 50 cm^2 herausgeschnitten.

Die Versuchsstücke dürfen nur mit sterilen Pinzetten oder Kornklammern, nicht aber mit den Fingern berührt werden.

6.3 Versuchsstückanzahl

6.3.1 Oberflächenkeimzahl der Wellpappe

Je Entnahmeeinheit sind mindestens 10 Versuchsstücke auszuschneiden, wenn nur eine Seite der Wellpappe zu prüfen ist; sind beide Seiten zu prüfen, sind 20 Versuchsstücke zu entnehmen. Die zugeschnittenen Versuchsstücke sind vor Fremdinfection bis zur Weiterverarbeitung zu schützen.

6.3.2 Oberflächenkeimzahl der Welle

Je Entnahmeeinheit sind mindestens 10 Versuchsstücke auszuschneiden, wenn nur eine Seite der Welle zu prüfen ist; sind beide Seiten der Welle zu prüfen, sind bei 3facher Wellpappe 20 Versuchsstücke zu entnehmen und bei 5facher Wellpappe 40 Versuchsstücke.

6.4 Herstellung der fertigen Proben mit Nährbodenplatte

6.4.1 Prüfverfahren: Oberflächenkeimzahl der Wellpappe

In die sterilen Petrischalen sind jeweils etwa 10 ml des im Dampftopf verflüssigten Nährbodens unter sterilen Bedingungen einzugießen. Nach Erstarren wird auf die noch feuchte Nährbodenoberfläche das Versuchsstück so aufgelegt und mit einer sterilen Pinzette angedrückt, daß die zu prüfende Seite nach oben zeigt. Anschließend wird das Versuchsstück gleichmäßig 2 mm hoch durch Aufgießen von etwa 7,5 bis 10 ml Nährboden (Gießtemperatur $48^\circ\text{C} \pm 2 \text{ grad.}$) vom Rand her übergossen. Nach dem Erstarren werden die Platten so in den Brutschrank gelegt, daß der Deckel der Petrischale unten liegt, um das Auftropfen von Kondenswasser auf die Probe zu verhindern.

6.4.2 Prüfverfahren: Oberflächenkeimzahl der Welle

6.4.2.1 Trennmethode 1

Von den Versuchsstücken wird mit Hilfe einer sterilen Pinzette die Deckschicht abgezogen, so daß die zu prüfende Welle freiliegt. Bei 5facher Wellpappe müssen gegebenenfalls Welle und Innenbahn abgetrennt werden. Beim Abziehen ist darauf zu achten, daß möglichst wenig Deckenpapier (In-

nenpapier) auf den Wellenkämmen zurückbleibt. Reste von Deckenpapier lassen sich auch mit einer sterilen Pinzette entfernen.

6.4.2.2 Trennmethode 2

Die Versuchsstücke werden mittels 2 ml Hilfslösung (5.2.1) so befeuchtet, daß die Hilfslösung möglichst nicht an den Schnittstellen herunterläuft.

Je nach Leimungsgrad, Stoffzusammensetzung und Dicke der Decke läßt sich diese mit einer sterilen Pinzette nach einer Einwirkzeit von höchstens 5 Minuten leicht abziehen. Bei 5fachen Wellpappen ist es angebracht, zur Arbeitserleichterung Deckschicht und Welle bis zur Innenbahn nach Trennmethode 1 zu entfernen und dann, wie oben angegeben, weiter zu verfahren.

6.4.2.3 Die nach Trennmethode 2 vorbereiteten Versuchsstücke werden wie unter 6.4.1 weiter verarbeitet.

6.5 Bebrütung

Die nach 6.4.1 (6.4.2.3) vorbereiteten Petrischalen werden 3 Tage bei 25°C bebrütet.

7. Versuchsauswertung

Die Petrischalen mit den Versuchsstücken werden nach Ablauf der Bebrütungszeit dem Brutschrank entnommen. Mit dem Keimzählgerät wird die Anzahl der Schimmelpilzkolonien, die auf dem Versuchsstück vorhanden sind, gezählt. Das Ergebnis der Auszählung von 10 Platten wird addiert, das arithmetische Mittel (KZ) gebildet und wie folgt die Oberflächenkeimzahl berechnet.

7.1 Oberflächenkeimzahl der Wellpappe

7.1.1 Versuchsstücke $6 \times 6 \text{ cm}$
 $\text{KZ} \cdot 2,78 = \text{OKZ}_s/100 \text{ cm}^2$

7.1.2 Versuchsstücke 50 cm^2
 $\text{KZ} \cdot 2,00 = \text{OKZ}_s/100 \text{ cm}^2$

7.2 Oberflächenkeimzahl der Welle

7.2.1 Versuchsstücke $6 \times 6 \text{ cm}$
 $\frac{278 \cdot \text{KZ}}{100 + E} = \text{OKZ}_s(W)/100 \text{ cm}^2$

7.2.2 Versuchsstücke 50 cm^2
 $\frac{200 \cdot \text{KZ}}{100 + E} = \text{OKZ}_s(W)/100 \text{ cm}^2$
E = Einzug der Welle in %.

8. Bestimmung des Wellenpapier einzuges

Ein Streifen Wellpappe der Breite ca. 1,5 cm und der Länge $10 \text{ cm} \pm 0,1 \text{ cm}$ (l_0) wird mit Hilfe des Messers herausgeschnitten. Anschließend wird die Welle herausgelöst, geglättet und die Länge (l_1) gemessen. Der Einzug wird wie folgt berechnet:

$$E \% = \frac{l_1 - l_0}{l_0} \cdot 100.$$

9. Prüfbericht

Im Prüfbericht sind unter Hinweis auf dieses Merkblatt anzuführen:

Art des untersuchten Materials,

Ort, Datum und Zeit der Probenahme,

pH-Wert der Probe nach DIN 53 124, Kaltextraktion,

Oberflächenkeimzahl (OKZ_s) mit Angabe der angewandten Methode, des arithmetischen Mittelwertes und der Einzelwerte,

Randbewuchs,

gegebenenfalls Abweichungen von der Vorschrift nach vorliegendem Merkblatt.

10. Anmerkungen

Das in diesem Merkblatt beschriebene Verfahren wurde in verschiedenen Laboratorien in mehreren Ringversuchen ge-

prüft. Es soll der Öffentlichkeit zur Stellungnahme vorgelegt werden und als Diskussionsgrundlage dienen. Im einzelnen ist noch zu sagen:

10.1 Dieses Merkblatt entspricht weitgehend dem Merkblatt Zellcheming IV/3/68. Infolge des Aufbaues der Wellpappe mußten verschiedene Besonderheiten dieses Verpackungsmaterials berücksichtigt werden. Eine Änderung wurde bei der Rezeptur des Nährbodens vorgenommen. Dieser wurde DIN 10 050, Blatt 3 (im Entwurf) angeglichen.

10.2 Es sind zwei Trennverfahren zur Bestimmung der Oberflächenkeimzahl an Wellenpapieren angegeben. Trennmethode 1: Dieser Trennmethode soll der Vorzug gegeben werden, da sich herausgestellt hat, daß sich bei den meisten Wellpappen die Deckschicht mit der Pinzette abziehen läßt. Sollten noch von den Deckenpapieren Reste auf den Wellenkämmen zurückbleiben, können diese mit der Pinzette entfernt werden.

Trennmethode 2: Da in immer größerem Umfang neue Klebstoffe für die Herstellung von Wellpappen verwendet werden, kann es beim Trennen nach Trennmethode 1 zu Schwierigkeiten kommen. Für diesen Fall wurde die Trennmethode 2 in dieses Merkblatt aufgenommen. Ein Nachteil dieser Prüfmethode kann

sein, daß bei zu langer Einwirkzeit von den Deckenpapieren Keime auf die Wellenpapiere verschleppt werden können. Aus diesem Grund ist es angebracht, in einem Vorversuch zu ermitteln, welches die günstigste Einwirkungszeit der Hilfslösung 5.2.1 ist, damit diese nicht bis auf die Wellenpapiere durchschlägt.

10.3 Das Ausschneiden der Proben bereitet bei Wellpappen in gewissem Umfang Schwierigkeiten. Um ein immer gleich großes Probestück zu erhalten, wurde die Verwendung einer Schablone als Hilfsmittel beim Schneiden vorgeschlagen. Günstiger erscheint der Einsatz eines Kreisschneiders, da dieser immer gleich große Probestücke liefert. Der Nachteil der bisher angebotenen Kreisschneider ist jedoch, daß diese schlecht sterilisierbar sind, die Klängen umständlich ausgetauscht werden müssen und sich schlecht abflambieren lassen. Das Modell 936a der Firma Frank hat sich für diesen Zweck ganz gut bewährt; es hat jedoch den Nachteil, daß es nicht unfallsicher ist. Trotzdem wurde das Kreisschneidverfahren in das Merkblatt aufgenommen, und es wäre zu begrüßen, wenn die zuständige Industrie ein geeignetes sterilisierbares Kreisschneidegerät entwickeln könnte.

10.4 Wachsimprägnierte Wellpappen können nach dem vorgeschriebenen Verfahren nicht geprüft werden.