

# Verpackungs-Rundschau

Literaturhinweis: Verpackungs-Rundschau 29 (1978) Nr. 7, Techn.-wiss. Beilage, Seiten 55 bis 56

## Merkblätter für die Prüfung von Packmitteln

Herausgegeben von den Arbeitsgruppen am Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung  
 an der Technischen Universität München — Institut der Fraunhofer-Gesellschaft

### Merkblatt 34

#### Prüfung von Weinkorken auf Sterilität

Herausgegeben von der Untergruppe „Mikrobiologie der Packstoffe“  
 der Arbeitsgruppe „Lebensmittelerhaltung und Mikrobiologie“ — Mai 1978

#### 1. Zweck und Anwendung

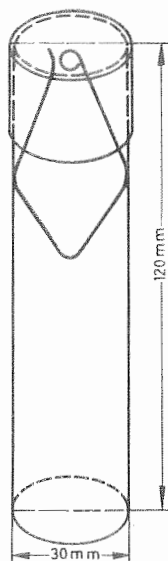
Dieses Merkblatt beschreibt ein Verfahren zur Überprüfung der Sterilität von Weinkorken. Durch die Wahl des Nährbodens lassen sich insbesondere säuretolerante Bakterien nachweisen, welche die Weinqualität beeinträchtigen können.

#### 2. Begriff

Die Sterilität von Weinkorken gilt als nachgewiesen, wenn nach einer Bebrütungszeit von 14 Tagen bei 25 °C in Orangenserum-Bouillon, anschließender Umimpfung auf Orangenserum-Agar und erneuter Bebrütung bei 25 °C nach drei Tagen keine Bakterien, Schimmelpilze oder Hefen gewachsen sind.

#### 3. Probenahme, Probenzahl

- 3.1. Die Proben sind so zu entnehmen, daß keine Sekundärinfektion eintreten kann. Das für den Transport der Proben verwendete Packmittel muß keimfrei sein.
- 3.2. Die Probenzahl muß pro Entnahmeeinheit mindestens 20 betragen.



Glasbehälter mit Drahtklammer aus rostfreiem Stahl und Kappe.

#### 4. Prüfgeräte

- 4.1. Brutschrank, regelbar auf eine Temperatur von 25 °C ± 1 K.
- 4.2. Autoklav für einen Betriebsdruck bis 3,4 bar und eine Sterilisationstemperatur bis 134 °C. Er muß so eingerichtet sein, daß eine Mindesttemperatur zwischen 110 und 120 °C auf ± 2 K genau eingehalten werden kann.
- 4.3. Heißluftsterilisator für eine Sterilisationstemperatur von 160 bis 170 °C.
- 4.4. Petrischalen aus Glas nach DIN 12 339 bzw. Einweg-Petrischalen aus Kunststoff, Durchmesser 87 bis 89 mm.
- 4.5. Meßpipette nach DIN 12 695, 1 ml, 25 ml.
- 4.6. Pipettenbüchsen.
- 4.7. Nährbodenflaschen, 300 ml, z. B. mit Kapsenbergkappen.
- 4.8. Bunsenbrenner (oder Spirituslampe).
- 4.9. Glasbehälter ca. 30 × 120 mm mit Drahtklammer aus rostfreiem Stahl und Kappe (siehe Bild).
- 4.10. Vakuum-Exsikkator mit Dreiwegehahn. Ein Schenkel des Dreiwegehahnes muß so eingerichtet sein, daß ein Membranfilter-Monitor oder Wattebausch zu befestigen ist.
- 4.11. Drigalski-Spatel.
- 4.12. Pinzette.
- 4.13. Elektronisches pH-Meßgerät mit Glaselektrode.
- 4.14. Bechergläser, DIN 23 312, 1 l.

#### 5. Nährmedien, Hilfslösungen und Filter

##### 5.1. Orangenserum-Bouillon

##### 5.1.1. Zusammensetzung:

10 g	Pepton aus Casein
3 g	Hefeextrakt
4 g	D(+)-Glucose
3 g	di-Kaliumhydrogenphosphat
<hr style="width: 20%; margin-left: 0;"/>	
20 g	
200 ml	Orangensaftserum

##### 5.1.2. Herstellung von Orangensaftserum:

Ein Liter frisch ausgepreßter Orangensaft wird auf ca. 95 °C erhitzt. Nachdem diese Temperatur erreicht ist, werden ca. 30 g Filter-Hilfsmittel zugesetzt und gut durch-

mischt. Mit Hilfe eines Büchner-Trichters wird der Orangensaft filtriert. Die ersten Milliliter des filtrierten Serums werden verworfen. Es ist empfehlenswert, nicht verbrauchtes Orangensaftserum 15 min bei 120 °C zu sterilisieren.

#### 5.1.3. Bereitung der Bouillon:

Die angegebenen Mengen Nährstoffe und Orangensaftserum werden 800 ml frisch destilliertem oder vollentsalztem Wasser zugesetzt. Der pH-Wert soll bei 20 °C  $5,5 \pm 0,1$  betragen. Er kann mit Hilfe von Natronlauge oder Weinsäure korrigiert werden. Die Lösung wird in vier 300-ml-Nährbodenflaschen umgefüllt. Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven 15 min bei 120 °C mit aufgesetzten Kapsenbergschrauben. Die Bouillon ist bei + 4 °C aufzubewahren. Eine Lagerzeit von 14 Tagen darf nicht überschritten werden.

#### 5.2. Orangenserum-Agar

##### 5.2.1. Zusammensetzung:

10 g	Pepton aus Casein
3 g	Hefeextrakt
5 g	Orangenextrakt oder 200 ml Orangensaftserum
4 g	D(+)-Glucose
3 g	di-Kaliumhydrogenphosphat
17 g	Agar-Agar
42 g	

##### 5.2.2. Bereitung:

Die angegebenen Mengen Nährstoffe werden einem Liter frisch destilliertem oder vollentsalztem Wasser — bei Verwendung von Orangensaftserum in 800 ml Wasser — zugesetzt und unter ausgiebigem Umschütteln gleichmäßig verteilt. Nach 15 min Stehen wird die Suspension in vier 300-ml-Nährbodenflaschen verteilt. Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven 15 min bei 120 °C mit aufgesetzten Kapsenbergschrauben. Der pH-Wert soll bei 20 °C  $5,5 \pm 0,1$  betragen.

##### 5.2.3. Vorbereitung der Petrischalen:

Nach Abkühlen des Nährbodens auf ca. 45 °C werden in die sterilen Petrischalen jeweils etwa 10 ml des flüssigen sterilen Nährbodens unter sterilen Bedingungen eingegossen und der Nährboden erstarren lassen. Sofort nach dem Eingießen wird der Petrischalendeckel aufgelegt. Die Petrischalen mit Nährboden sind bei + 4 °C aufzubewahren; eine Lagerzeit von 14 Tagen darf nicht überschritten werden.

### 6. Durchführung der Prüfung

#### 6.1. Sterilisation der Geräte

Glaspetrischalen, Pinzetten, Exsikkatoren, Drigalski-Spatel, Glasbehälter mit Drahtklammern und Kappen und Pipetten in Pipettenbüchsen werden im Heißluftsterilisator 2 h lang bei 160 °C sterilisiert. Die Luftlöcher der Pipettenbüchsen werden während der Sterilisation offen gehalten und danach geschlossen.

#### 6.2. Durchführung

Die Korken werden der Umverpackung entnommen und unter sterilen Bedingungen in die sterilisierten Glasbehälter gegeben. Mit der Drahtklammer werden die Korken vorsichtig unter sterilen Bedingungen fixiert und mit 25 ml Orangenserum-Bouillon (nach Abschnitt 5.1) übergossen. Die so vorbereiteten Behälter werden mit einer sterilen Kappe abgedeckt und in den Exsikkator gesetzt. Nach Verschließen des Exsikkators wird eine Wasserstrahlpumpe an den im Deckel eingesetzten Dreiwegehahn angeschlossen und die Luft vorsichtig in 2 x 30 min evakuiert. Nach jeder Evakuierung muß auf Normaldruck belüftet werden.

Die Belüftung erfolgt über Membranfilter oder Wattebausch, um eine Reinfektion auszuschließen.

Die so vorbereiteten Proben werden 14 Tage bei 25 °C bebrütet. Danach werden jeweils 0,1 ml der Bouillon auf Petrischalen mit Orangenserum-Agar (nach Abschnitt 5.2) pipettiert und mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert. Es ist jeweils eine Parallelprobe anzusetzen.

#### 6.3. Bebrütung

Die Petrischalen werden drei Tage bei 25 °C bebrütet.

### 7. Versuchsauswertung

Die Petrischalen werden nach Ablauf der Inkubationszeit dem Brutschrank entnommen und auf Bakterien-, Hefen- und Schimmelpilzwachstum untersucht. Bei negativem Ergebnis gilt die Sterilität der Weinkorken als nachgewiesen. Bei Bewuchs sind die Keimarten anzugeben.

### 8. Prüfbericht

Im Prüfbericht sind unter Hinweis auf dieses Merkblatt anzugeben:

- Art der untersuchten Korken;
- Ort, Datum und Zeit der Probenahme;
- Ergebnis der Sterilitätsüberprüfung (Anwesenheit säuretoleranter Bakterien/Schimmelpilze/Hefen);
- Bebrütungszeit;
- gegebenenfalls Abweichungen von diesem Merkblatt.

### 9. Anmerkungen

- 9.1. Dieses Merkblatt wurde an Weinkorken, die nach verschiedenen Verfahren sterilisiert waren, in einem Ringversuch überprüft.
- 9.2. Es ist empfehlenswert, eine Nullprobe in die Bestimmung mit einzubeziehen. Dabei wird genau nach Vorschrift vorgegangen, jedoch ohne Weinkorken.
- 9.3. Wird bereits ein Wachstum von Mikroorganismen innerhalb von 14 Tagen Bebrütungszeit in Orangenserum-Bouillon beobachtet (Trübung, Kahmhautbildung, Schimmelrasen), so ist der Versuch abzubrechen, wobei die Weinkorken unter Angabe der benötigten Inkubationszeit als nicht steril bewertet werden.
- 9.4. Anstelle des Ausplattierens der Bouillon auf Orangenserum-Agar kann diese auch über Membranfilter mit Orangenserum-Nährkartonscheiben, z. B. Sartorius-Membranfilter SM 14 012 (Nährkartonscheibe), ausgewertet werden.
- 9.5. Die Nährmedien können auch als Trockennährböden in den zuvor beschriebenen Zusammensetzungen bezogen werden. Trockennährmedien werden nach der Vorschrift der Hersteller aufgelöst, gekocht und sterilisiert. Die Hersteller-codes sind wie folgt:
  - Orangenserum-Bouillon:
    - DIFCO 0518
    - Merck 10 674
  - Orangenserum-Agar:
    - DIFCO 0521
    - Merck 10 673
    - BBL 11 486
- 9.6. Anstelle der vorgeschlagenen Glasbehälter können auch sterile Einmal-Kunststoffbehälter eingesetzt werden. Zum Fixieren der Weinkorken können anstelle der Klammer auch Glas- oder rostfreie Stahlkugeln mit geeigneter Masse verwendet werden.