

Univerza
v Ljubljani *Biotehniška*
fakulteta



Oddelek za lesarstvo
Delovna skupina za kemijo lesa

Odlični v znanosti 2015

Biotehniške vede

Področje: Gozdarstvo lesarstvo papirništvo

Ali so grče in „rdeče srce“ navadne bukve vir dragocenih spojin?

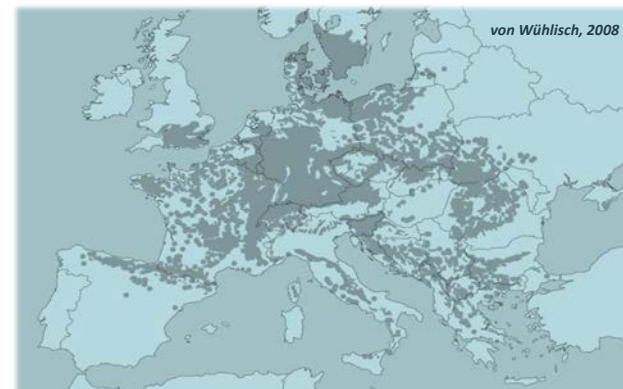
Ekstraktivi v mehansko poškodovanem lesu in grčah bukve

Extractives of mechanically wounded wood and knots in Beech

Viljem Vek, Primož Oven, Thomas Ters, Ida Poljanšek, Barbara Hinterstoisser



DE GRUYTER *Holzforschung, 2014, 68, 5: 529-539. COBISS.SI-ID 2166153*



von Wühlisch, 2008

Razširjenost navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.)

Uvod

- Bukev velja za drevo Evrope; 31,9 % lesne zaloge v slovenskih gozdovih (ZGS, 2012).

- Bukev je ekonomsko pomembna drevesna vrsta; bukovina je večnamenski material:

VEKTAL d.o.o.
PROZVODNJA • TRGOVINA • STORITVE
Stadla črna 101, 1000 Ljubljana, Slovenija



- Ploskovno pohištvo, vezan les, talne obloge
- Konstrukcijski les, unikatni izdelki
- Krivljen les → Thonetov stol št. 14, 1859
- Impregnirani železniški pragovi
- Energent
- Surovina v papirni industriji.

Michael Thonet, „Chair of chairs“



Yoshimoku



Orra Case

Lesena gradnja: Oddelek za lesarstvo, UL-BF



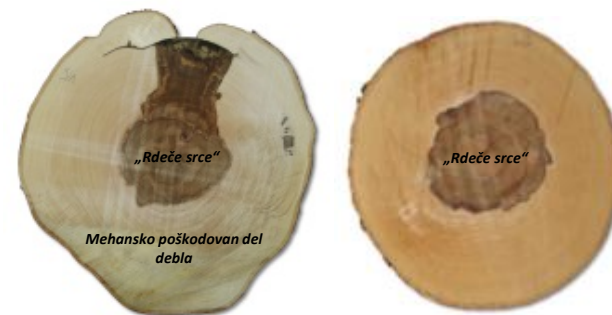
Furnity





Uvod

- Uporabo lesa bukve omejuje barvna sprememba (diskoloracija), t.i. rdeče srce. Tržna vrednost diskolorirane bukovine je nižja:
 - Slaba impregnabilnost
 - Težave pri sušenju
 - Med postopkom luščenja rad poka
 - Estetska hiba.
- Nastanek diskoloracije je posledica mehanske poškodbe (npr. odlom veje, direktne mehanske poškodbe) → prva faza v zaporedju številnih kompleksnih procesov.
- Kompartimentalizacija (model CODIT, Shigo in Marx 1977) → drevesa prostorsko omejuje negativne posledice poškodb na čim manjši volumen:
 - Obstoječa in novonastala tkiva
 - Kemične snovi, bioaktivni ekstraktivi.



Diskoloracija pri bukvi.



Uvod

- Ekstraktivi so nestrukturane komponente lesa, nizkomolekularne spojine:
 - Primarni metaboliti (steroli, organske kisline in enostavni sladkorji, ...)
 - Sekundarni metaboliti (terpenoidi, alkaloidi, fenilpropanoidi)
 - Starostni procesi (ojedritev)
 - Travmatski dogodki (mehanska poškodba, glivna okužba)
 - Lipofilni ekstraktivi → mehanska zaščita
 - Hidrofilni ekstraktivi → kemična zaščita.

Jedrovina; *Prunus domestica* L.„Rdeče srce“; *Fagus sylvatica* L.Poranitveni les; *Fagus sylvatica* L.

Cilji

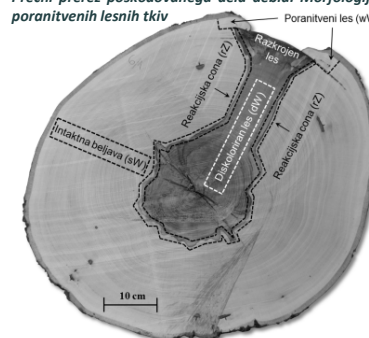
- V ekstraktih ranitvenih lesnih tkiv debla in grč bukve:
 - Učinkovit ekstrakcijski postopek za pridobivanje ekstraktivov iz lesa bukve s sistemom za pospešeno ekstrakcijo
 - Kvalitativno in kvantitativno vrednotenje lesnih ekstraktivov
 - Preučiti relevantnost bukovine kot naravni vir za pridobivanje dragocenih spojin.



Material in metode

- Analizo izvedli na več mehansko poškodovanih bukvah (*Fagus sylvatica* L.):
 - Starost dreves = 113 - 221 let, $h_{\text{drevesa}} = 24,6 - 32,8$ m; Starost poškodbe = 9 - 29 let
 - Rastišče: Gozd Kočevskega Roga, okolica Podturna pri Dolenjskih Toplicah
 - Priprava vzorcev ranitvenih tkiv debla in grč
 - Poranitveni les (wW), intaktna blejava (sW), reakcijska cona (rZ), diskoloriran les (dW)
 - Grče oziroma baze živih (IK) in mrtvih vej (dK)
 - Mletje z Retsch SM2000 in ZM200 + suhi led (CO_2), 0,5 mm lesna frakcija.

Prečni prerez poškodovanega dela debla: Morfologija poranitvenih lesnih tkiv



- Vzorce ekstrahirali na sistemu za pospešeno ekstrakcijo:
 - Lesni vzorci liofilizacijsko posušeni pri -54 °C in 0,054 mbar
 - Lipofilni ekstraktivi; cikloheksan
90 °C, 110 bar, 2 × 15 min statični cikel
 - Hidrofilni ekstraktivi; 95 % metanol (aq)
100 °C, 110 bar, 2 × 15 min statični cikel.



Büchi SpeedExtractor E-916





Material in metode

- Semi-kvantitativna analiza vzorcev z UV-Vis spektrofotometrijo (Perkin-Elmer Lambda UV-Vis):
 - Celokupni fenoli → Folin-Ciocalteu metoda; $\lambda = 765 \text{ nm}$, ESTD-galna kislina ($\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{lesa}}$)
 - Proantocianidini → vanilinski test; $\lambda = 500 \text{ nm}$, ESTD-katehin ($\text{mg}_{\text{CatE}}/\text{g}_{\text{lesa}}$).

- Derivatizacija za GC/MS analizo:
 - Kemijska modifikacija vzorcev s sililacijo,
 - ISTD → C21:0 in betulin,
 - BSTFA + TMCS + piridin → 45 min at 70 °C.

- Kromatografska GC/MS analiza na dolgi koloni:
 - GC-FID 7890 sistem → HP-5 kolona (30 m × 320 μm × 0.25 μm) + FID detektor (300 °C)
 - GC 7890A sistem + 5975C MSD → HP5-MS kolona + MS-EI detektor (280 °C, 70 eV)
 - Rezultati kvantitativne analize v mg identificirane spojine na g suhega lesa.





Rezultati

- Ekstrakcija poranitvenega lesa debela in grč bukve:
 - 10 mg/g lipofilnih ekstraktivov
 - 47 mg/g hidrofilnih ekstraktivov
 - Hidrofilnih ekstraktivov tudi do 6-krat več kot lipofilnih ekstraktivov.
- Vsebnosti hidrofilnih ekstraktivov ter celokupnih fenolov in proantocianidinov:

- Največ v poranitvenem lesu in grčah



- Najmanj v diskoloriranih tkivih (rdeče srce).



- Izrazita variabilnost v vsebnosti ekstraktivov med različnimi kategorijami lesnih tkiv.

Kategorija lesa	Vsebnost ekstraktivov		Vsebnost celokupnih	
	Lipofilni (mg g ⁻¹)	Hidrofilni (mg g ⁻¹)	Fenolov (mg g ⁻¹)	Proantoci. (mg g ⁻¹)
Poranitveni les (wW)	10.7 ^a (8.7)	57.0 ^a (18.3)	17.0 ^a (5.38)	3.4 ^a (1.33)
Beljava (sW)	9.7 ^a (6.1)	42.1 ^b (12.7)	12.2 ^b (5.17)	1.8 ^b (0.78)
Reakcijska cona (rZ)	10.1 ^a (5.4)	37.4 ^{b, c} (13.3)	7.5 ^c (2.24)	1.1 ^c (0.39)
Diskoloriran les (dW)	12.5 ^a (8.0)	29.4 ^c (11.4)	4.0 ^d (2.17)	0.5 ^c (0.44)
Živa grča (IK)	7.8 ^a (5.0)	61.7 ^a (12.1)	16.9 ^a (2.85)	4.0 ^a (0.93)
Mrtva grča (dK)	9.9 ^a (4.2)	66.8 ^a (10.6)	19.7 ^a (3.14)	5.2 ^d (1.06)



Rezultati

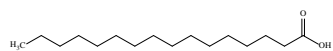
- Identificirani lipofilni ekstraktivi v ekstraktih bukve:
 - Proste maščobne kisline in maščobni alkoholi

- Triterpeni, prosti steroli.

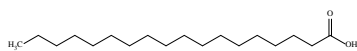


Rezultati

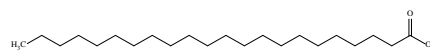
- Identificirani lipofilni ekstraktivi v ekstraktih bukve:
 - Proste maščobne kisline in maščobni alkoholi



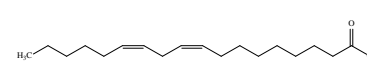
Palmitična C16:0 kislina



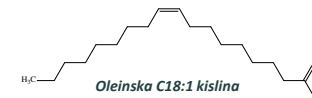
Stearinska C18:0 kislina



Behenska C22:0 kislina

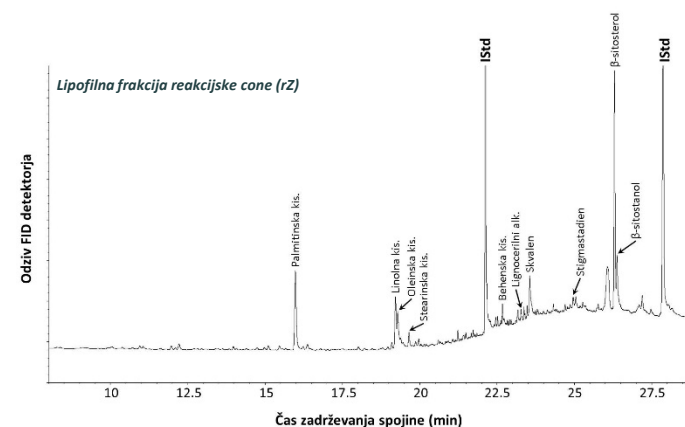


Linolna kislina C18:2



Oleinska C18:1 kislina

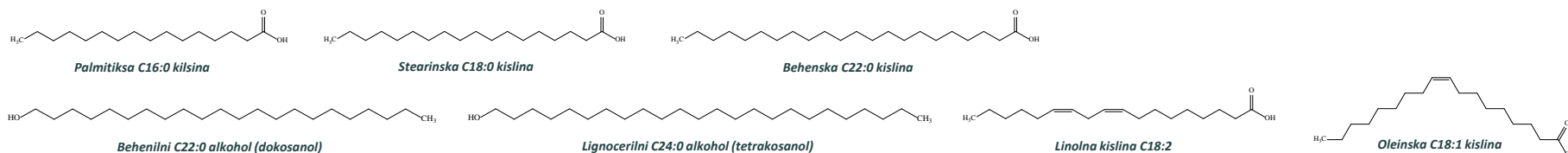
- Triterpeni, prosti steroli.



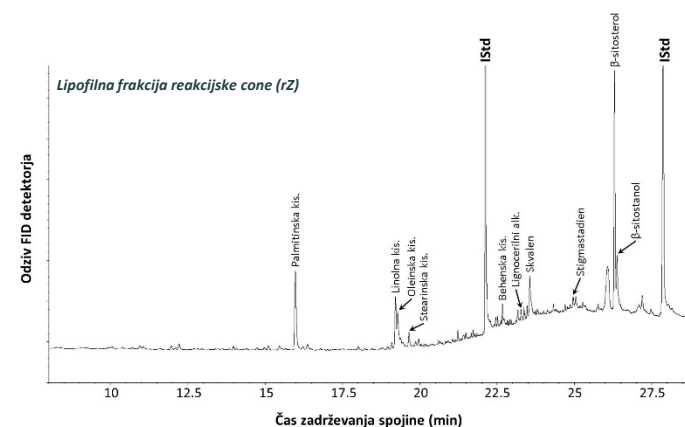


Rezultati

- Identificirani lipofilni ekstraktivi v ekstraktih bukve:
 - Proste maščobne kisline in maščobni alkoholi



- Triterpeni, prosti steroli.

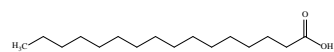




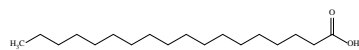
Rezultati

Identificirani lipofilni ekstraktivi v ekstraktih bukve:

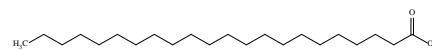
Proste maščobne kisline in maščobni alkoholi



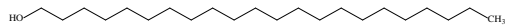
Palmitična C16:0 kislina



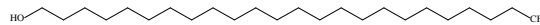
Stearinska C18:0 kislina



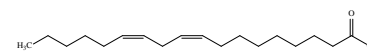
Behenska C22:0 kislina



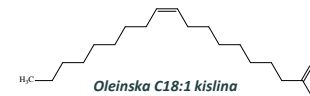
Behenilni C22:0 alkohol (dokosanol)



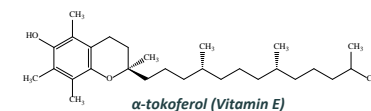
Lignocerilni C24:0 alkohol (tetrakosanol)



Linolna kislina C18:2

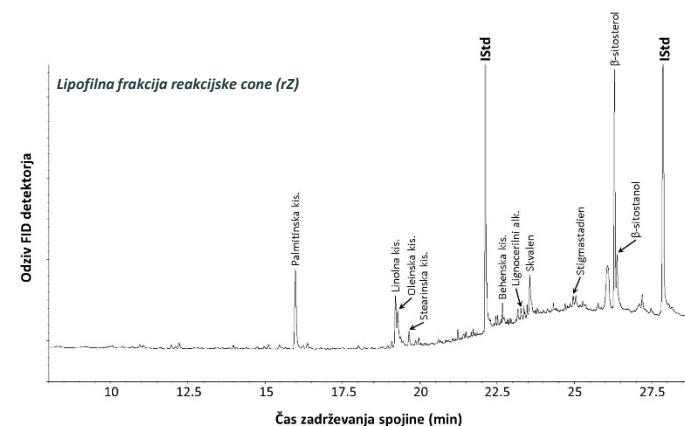


Oleinska C18:1 kislina

 α -tokoferol (Vitamin E)

V lesnih tkivih na bazi živih in mrtvih vej se pojavlja tudi vitamin E.

Triterpeni, prosti steroli.

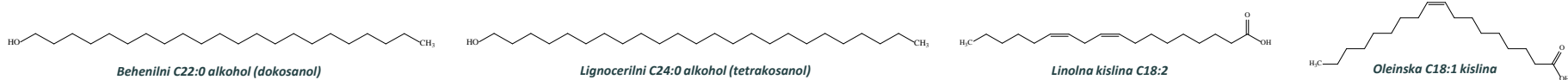
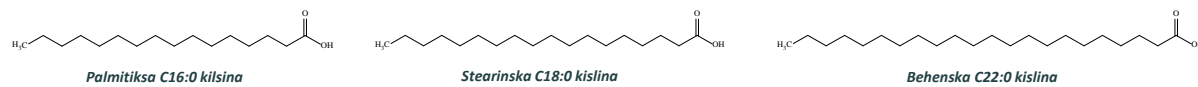




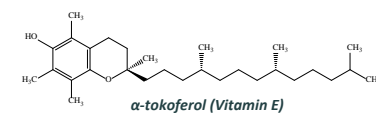
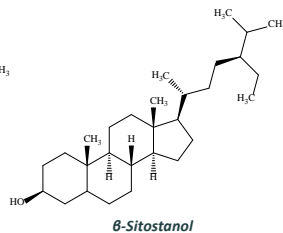
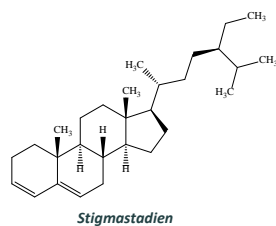
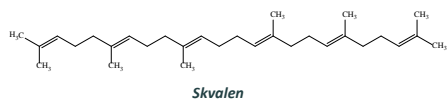
Rezultati

- Identificirani lipofilni ekstraktivi v ekstraktih bukve:

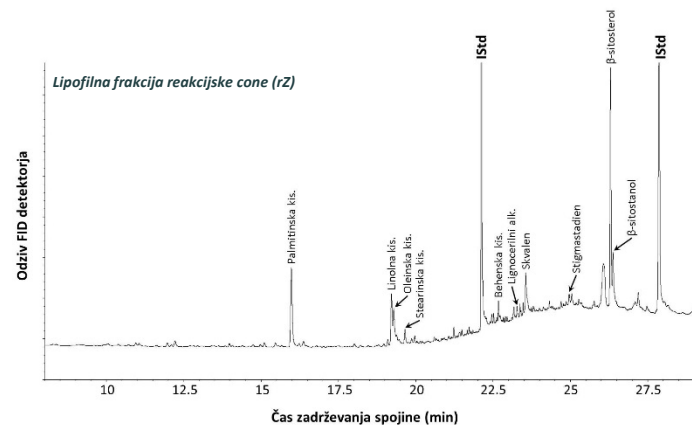
- Proste maščobne kisline in maščobni alkoholi



- Triterpeni, prosti steroli.



V lesnih tkivih na bazi živih in mrtvih vej se pojavlja tudi vitamin E.

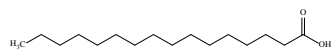




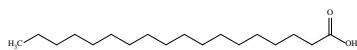
Rezultati

■ Identificirani lipofilni ekstraktivi v ekstraktih bukve:

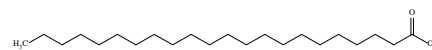
■ Proste maščobne kisline in maščobni alkoholi



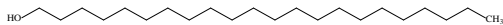
Palmitična C16:0 kislina



Stearinska C18:0 kislina



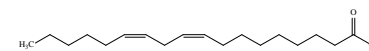
Behenska C22:0 kislina



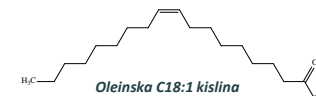
Behenilni C22:0 alkohol (dokosanol)



Lignocerilni C24:0 alkohol (tetrakosanol)

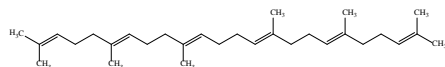


Linolna kislina C18:2

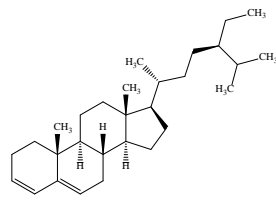


Oleinska C18:1 kislina

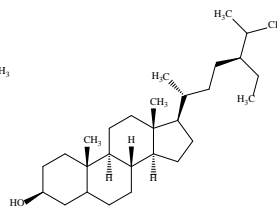
■ Triterpeni, prosti steroli.



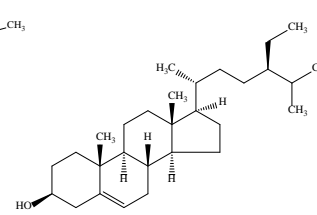
Skvalen



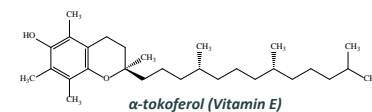
Stigmastadien



β-Sitostanol

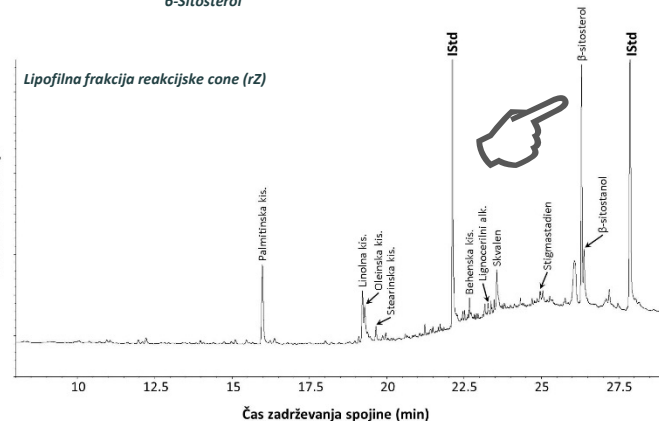


β-Sitosterol



α-tokoferol (Vitamin E)

V lesnih tkivih na bazi živih in mrtvih vej se pojavlja tudi vitamin E.

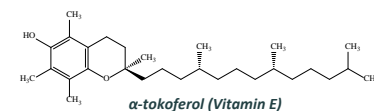
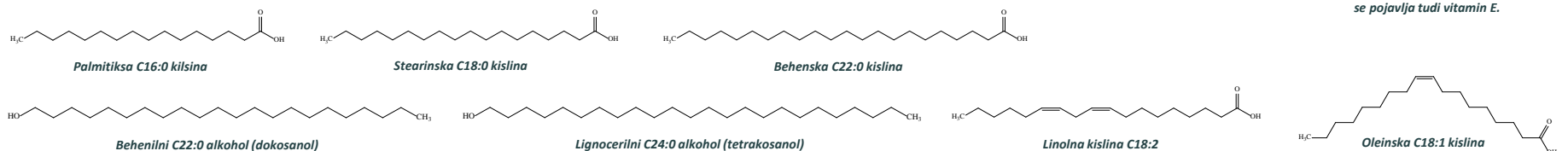




Rezultati

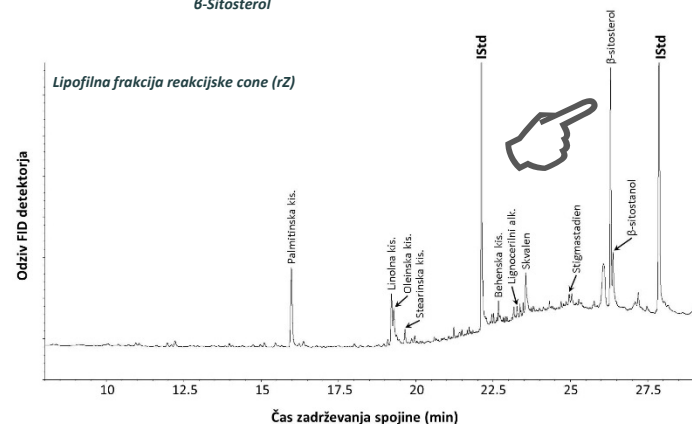
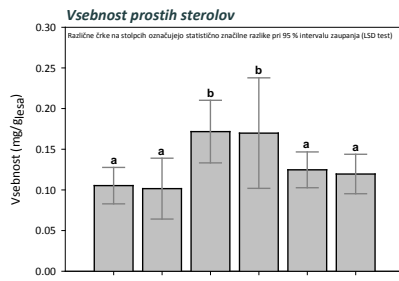
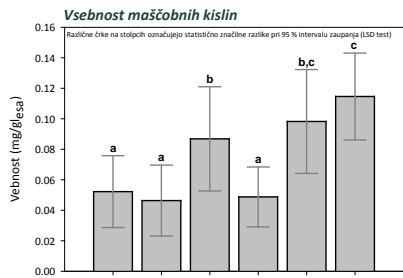
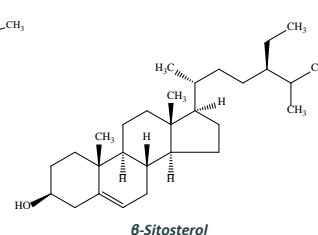
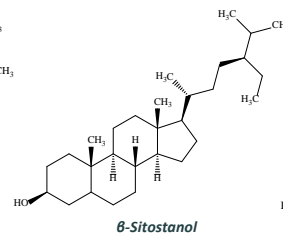
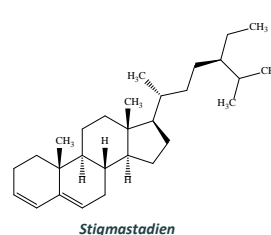
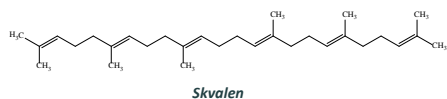
- Identificirani lipofilni ekstraktivi v ekstraktih bukve:

 - Proste maščobne kisline in maščobni alkoholi



V lesnih tkivih na bazi živih in mrtvih vej se pojavlja tudi vitamin E.

 - Triterpeni, prosti steroli.



ww - poranjen les; sw - blejava; rz-reakcijska cona; dw-diskoloriran les („rdeče srce“); ik - živa grča, dk - mrtva grča



Rezultati

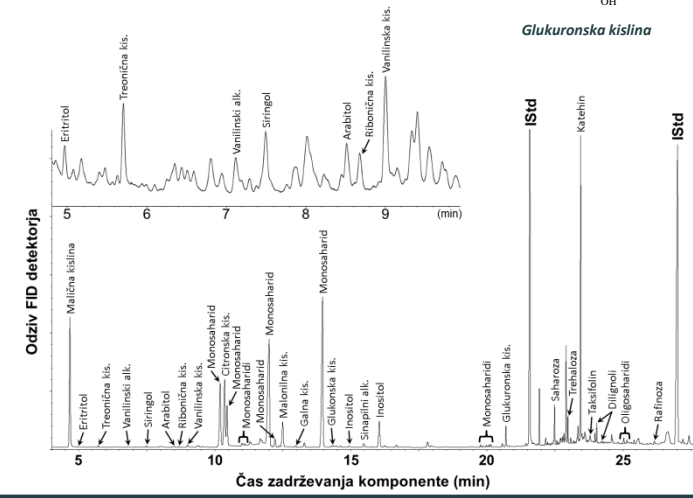
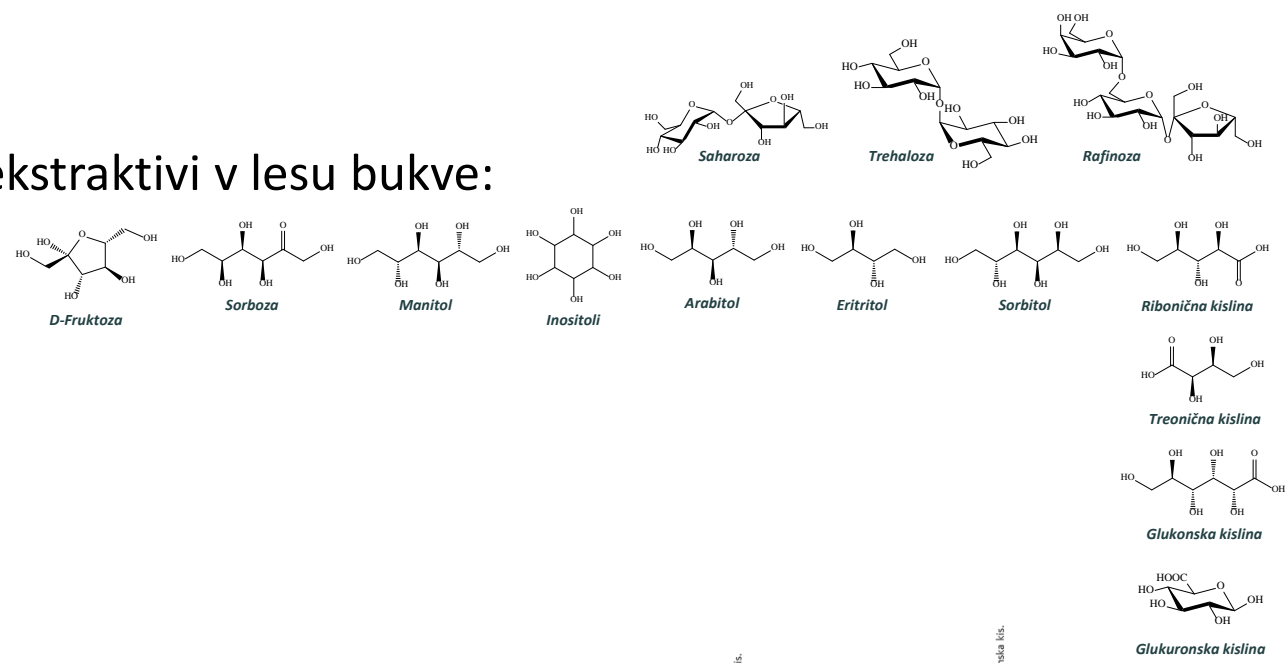
- Identificirani hidrofilni ekstraktivi v lesu bukve:
 - Topni sladkorji
 - Karboksilne kisline
 - Enostavni fenoli
 - Flavonoidi.



Rezultati

Identificirani hidrofilni ekstraktivi v lesu bukve:

- Topni sladkorji
- Karboksilne kisline
- Enostavni fenoli
- Flavonoidi.

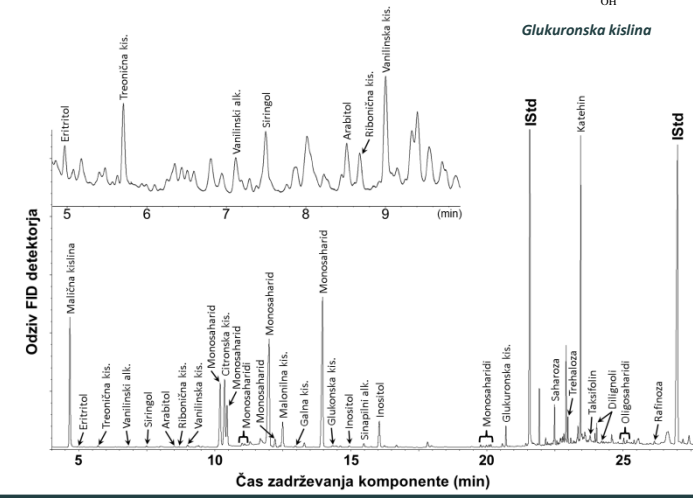
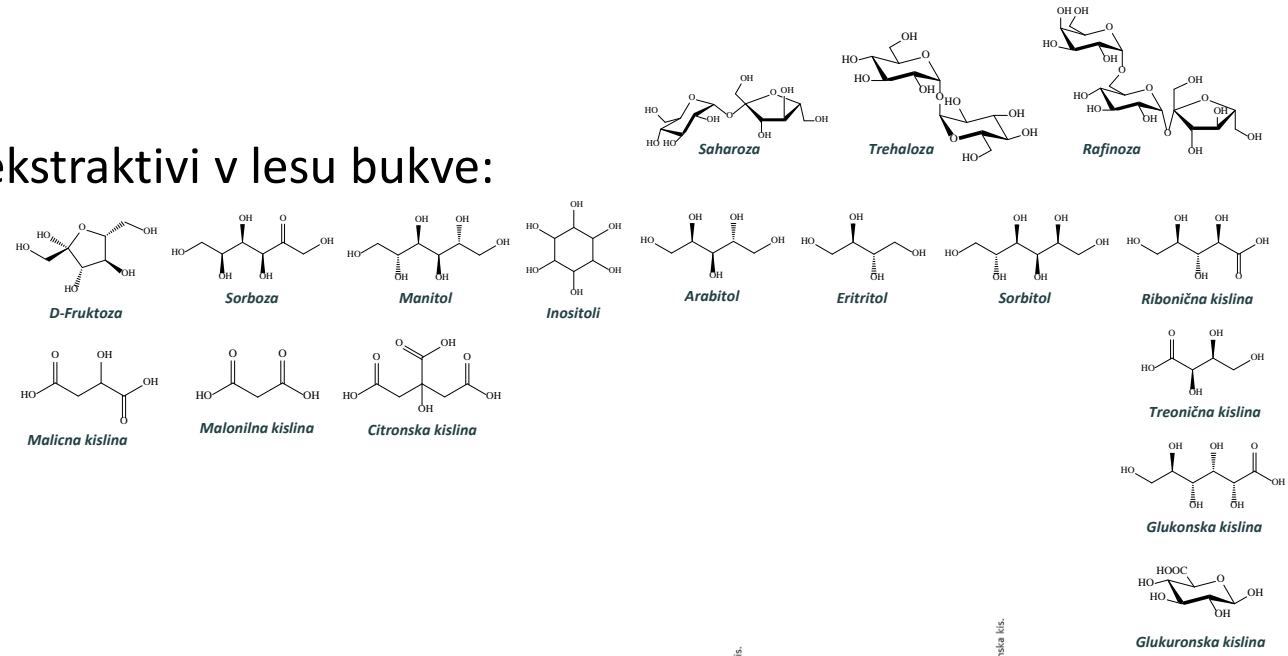




Rezultati

Identificirani hidrofilni ekstraktivi v lesu bukve:

- Topni sladkorji
- Karboksilne kisline
- Enostavni fenoli
- Flavonoidi.

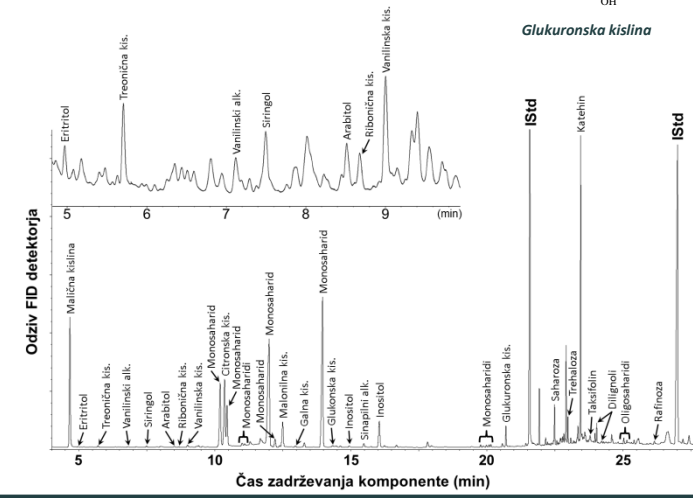
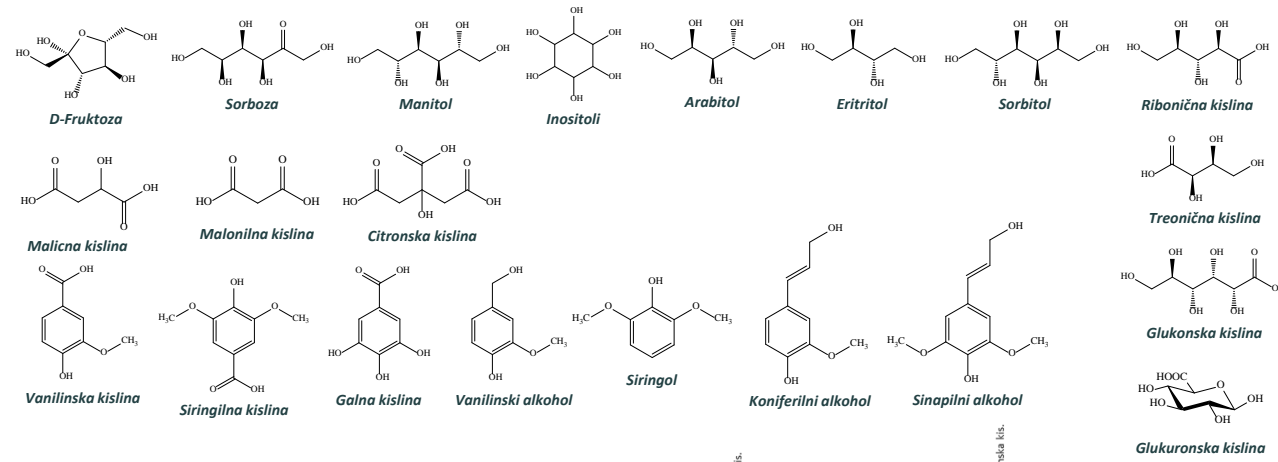
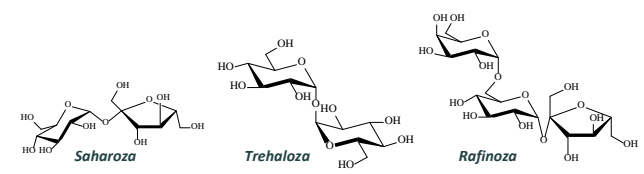




Rezultati

Identificirani hidrofilni ekstraktivi v lesu bukve:

- Topni sladkorji
- Karboksilne kisline
- Enostavni fenoli
- Flavonoidi.

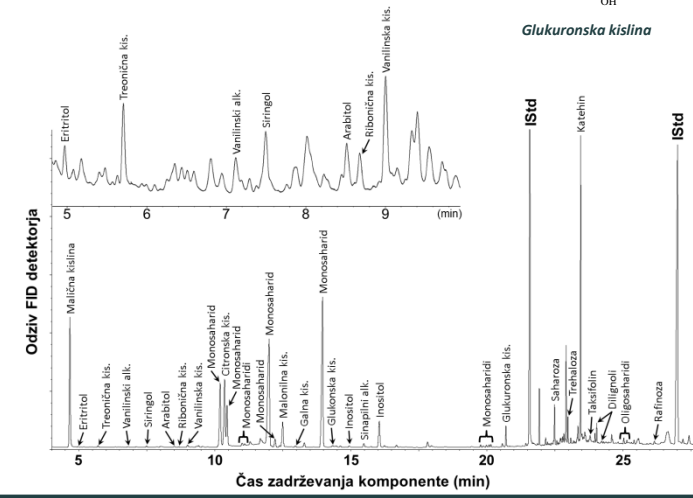
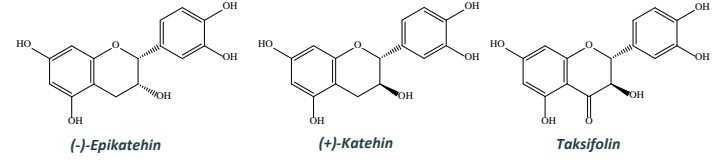
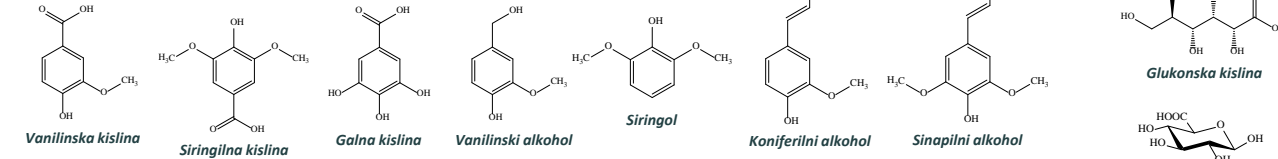
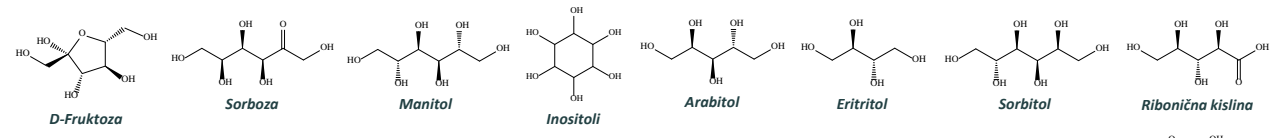
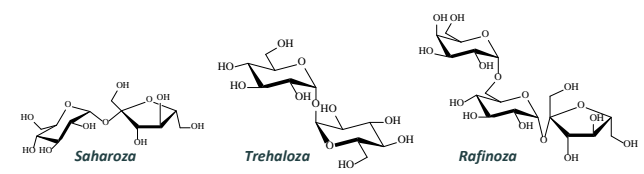




Rezultati

Identificirani hidrofilni ekstraktivi v lesu bukve:

- Topni sladkorji
- Karboksilne kisline
- Enostavni fenoli
- Flavonoidi.

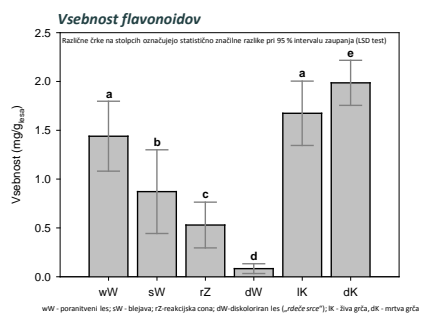
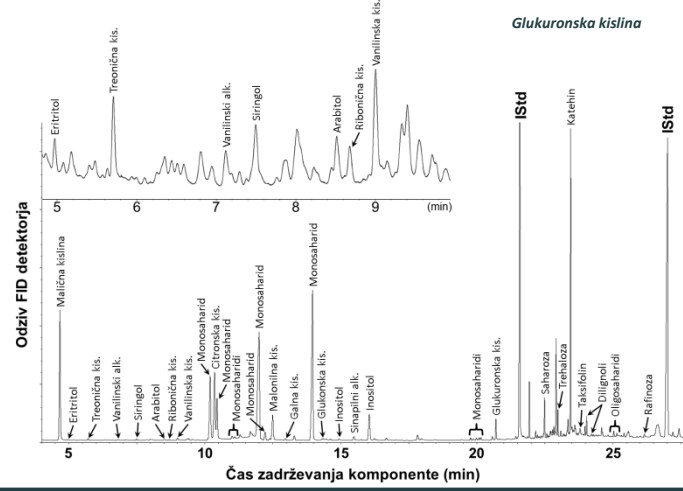
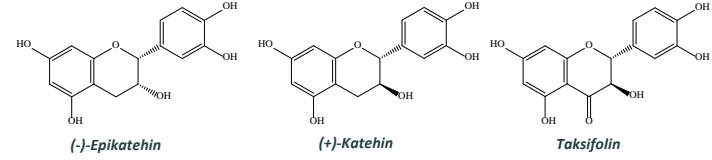
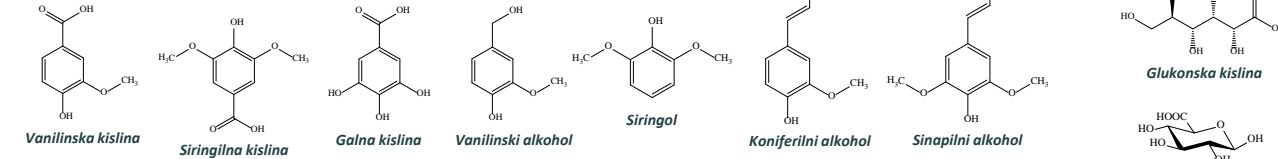
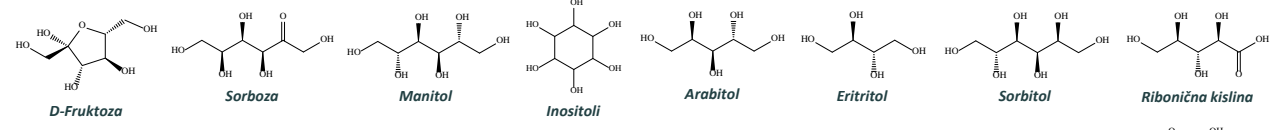
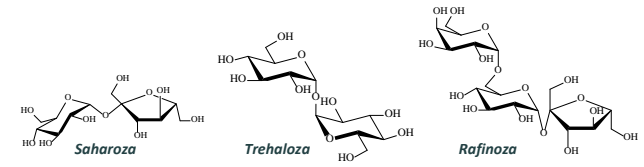




Rezultati

■ Identificirani hidrofilni ekstraktivi v lesu bukve:

- Topni sladkorji
- Karboksilne kisline
- Enostavni fenoli
- Flavonoidi.

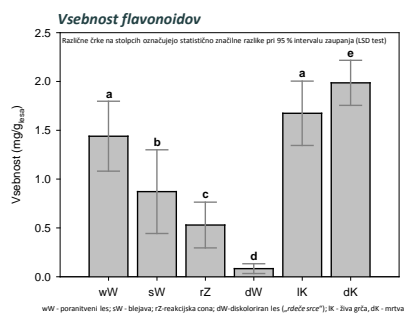
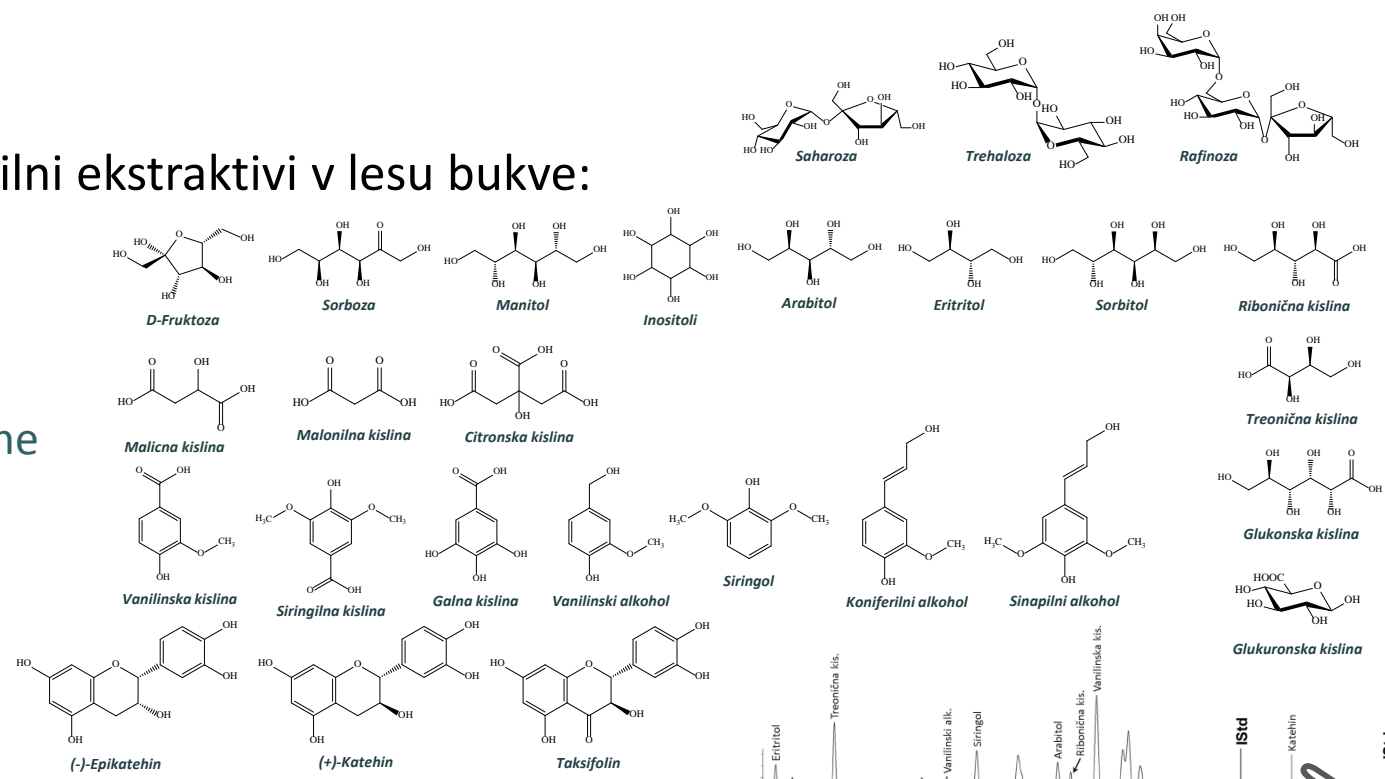




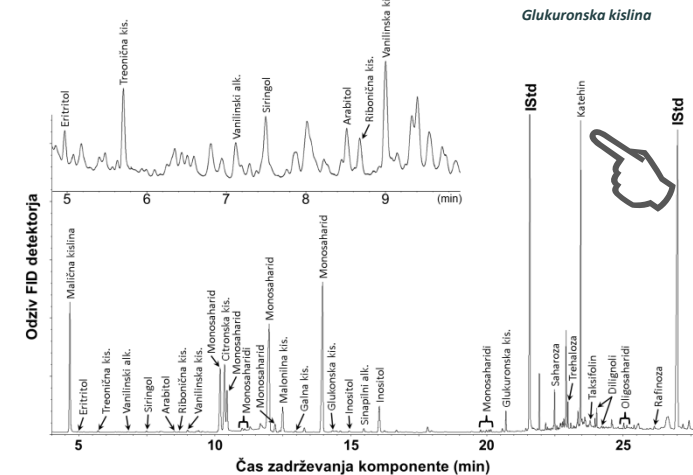
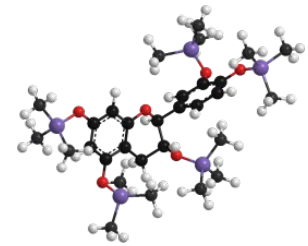
Rezultati

■ Identificirani hidrofilni ekstraktivi v lesu bukve:

- Topni sladkorji
- Karboksilne kisline
- Enostavni fenoli
- Flavonoidi.



Karakteristično fenolno spojino ekstraktov lesa bukve predstavja katehin (na sliki trimetilsililni derivat).

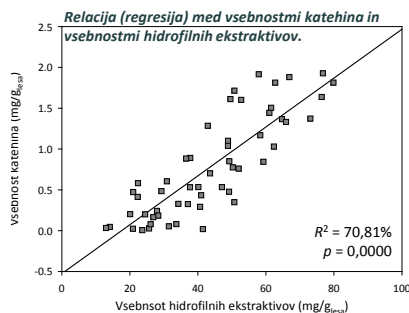
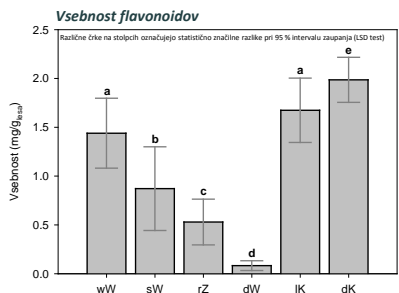
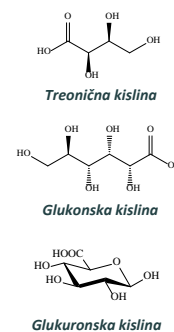
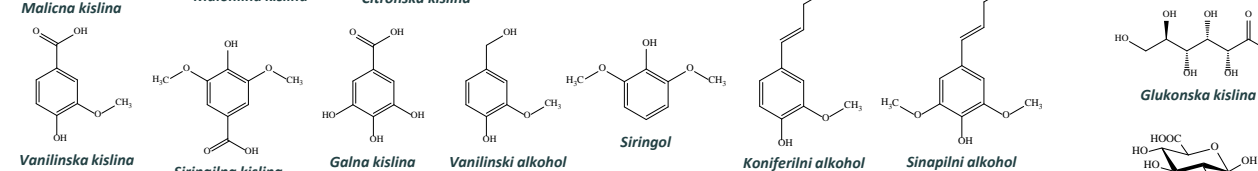
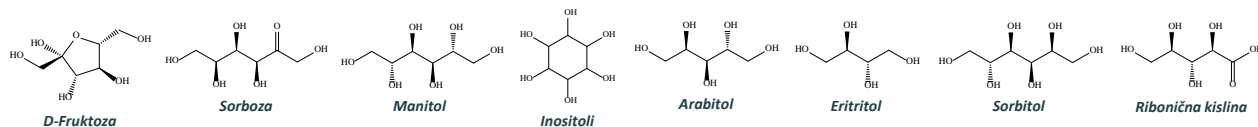
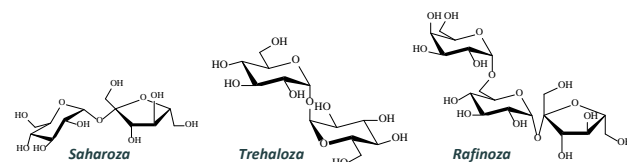




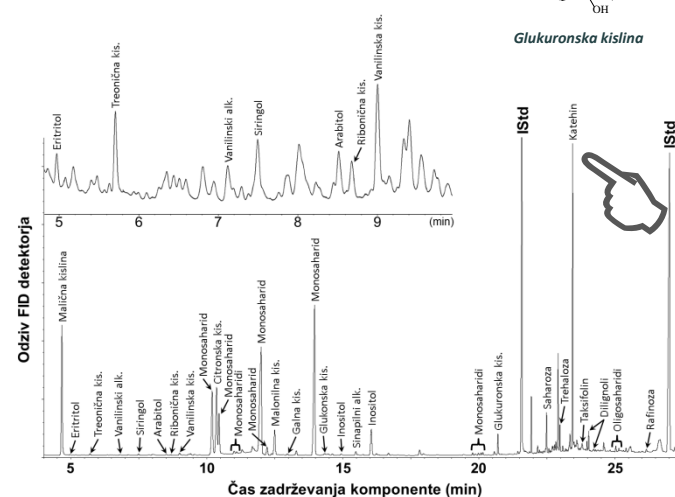
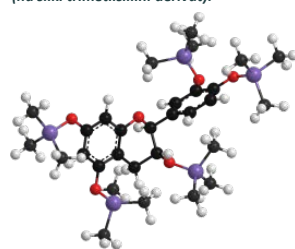
Rezultati

■ Identificirani hidrofilni ekstraktivi v lesu bukve:

- Topni sladkorji
- Karboksilne kisline
- Enostavni fenoli
- Flavonoidi.



Karakteristično fenolno spojino ekstraktov lesa bukve predstavljajo katehin (na sliki trimetilsililni derivat).



vW - poravnani les; sW - blejva; rZ - reakcijska zona; dW - diskoloriran les („dele srece“); IK - šiva grča; dK - mrtva grča



Zaključki

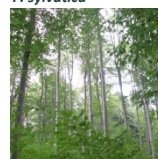
- Prva celovita preiskava ekstraktivov v poškodovanem lesu in grčah navadne bukve.
- Razvili smo metodo za učinkovito pridobivanje ekstraktivov iz lesa bukve s sistemom za pospešeno ekstrakcijo (Büchi SpeedExtractor E-916).
- Grče bukve vsebujejo več ekstraktivov kot poškodovana in intaktna debelna tkiva:
 - Vsebnost fenolnih spojin v grčah relativno visoka (cca 17 g na kg lesnih ostankov → vej).
- Poškodba → pomemben vir variabilnosti v vsebnosti nizkomolekularnih spojin v živem drevesu.

- Pridobivanje dragocenih spojin:

P. nigra



F. sylvatica

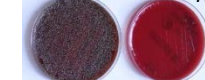


R. pseudoacacia

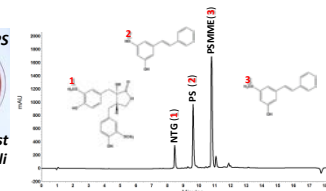


Inhibicija razvoja bakterij

Kontrola

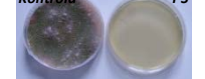


Gojišče krvni agar za rast bakterij (KA): Escherichia coli



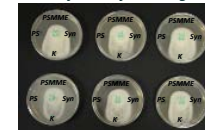
Inhibicija razvoja plesni

Kontrola



Gojišče za plesni in kvasovke (DSA): Aspergillus niger

Inhibicija razvoja lesnih gliv



»Diffusion« test: Schizophyllum commune

www.facebook.com/projectpinobio

PINO BIO

Mednarodni raziskovalni projekt v okviru WoodWisdom ERA-NET: „Pinosilvins as novel bioactive agents for food application“.



Zahvala

- Javni agenciji za raziskovalno dejavnost republike Slovenije (ARRS) za finančno podporo v okviru programa za usposabljanje mladih raziskovalcev ter programske skupine P4 - 0015 – 0481.
- Thomasu Tersu in dr. Karin Fackler ter ostalim sodelavcem z Inštituta za kemijsko inženirstvo Tehniške univerze na Dunaju (TU Wien).
- Robertu Krajncu (GIS) za pomoč pri organizaciji in izvedbi poseka dreves.