

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA LESARSTVO

Davor DEMŠAR

**ANALIZA VSEBNOSTI PROANTOCIANIDINOV V
LESU BUKVE Z UV-VIS SPEKTROFOTOMETROM**

DIPLOMSKI PROJEKT

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA LESARSTVO

Davor DEMŠAR

**ANALIZA VSEBNOSTI PROANTOCIANIDINOV V LESU BUKVE Z
UV-VIS SPEKTROFOTOMETROM**

DIPLOMSKI PROJEKT
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**ANALYSIS OF PROANTHOCYANIDINS CONTENT IN BEECH
WOOD USING A UV-VIS SPECTROPHOTOMETER**

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2015

Diplomski projekt je zaključek univerzitetnega študija Lesarstva – 1. stopnja. Delo je bilo izvedeno v Delovni skupini za kemijo lesa na Oddelku za lesarstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Senat Oddelka za lesarstvo je za mentorja diplomskega dela imenoval prof. dr. Primoža Ovna, za somentorico doc. dr. Ido Poljanšek in za recenzenta prof. dr. Marka Petriča.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Davor Demšar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	UDK 630*813.2
KG	bukev/ <i>Fagus sylvatica</i> /ekstraktivi/proantocianidini/spektrofotometrija
AV	DEMŠAR, Davor
SA	OVEN, Primož (mentor)/POLJANŠEK, Ida (somentorica)/PETRIČ, Marko (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, c.VIII/34
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo
LI	2015
IN	ANALIZA VSEBNOSTI PROANTOCIANIDINOV V LESU BUKVE Z UV-VIS SPEKTROFOTOMETROM
TD	Diplomski projekt (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
OP	VIII, 50 str., 1 pregl., 76 sl., 11 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V tem delu smo raziskali vsebnost proantocianidinov v lesu bukve. Drevesa smo posekali v Kočevskem Rogu. Požagali smo jih tako, da smo dobili vsa potrebna tkiva za nadaljno raziskavo. Najprej smo izžagali kolute, ki smo jih nato razžagali, zmleli in posušili. Dobljene vzorce smo nato ekstrahirali, izvedli smo po dve ekstrakciji. Najprej smo izvedli ekstrakcijo po Soxhletu. Z njo smo dobili vsebnost vseh snovi, ki so topni v mešanici metanola in vode, ter vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov. Nato smo izvedli še dietiletrsko ekstrakcijo, s katero smo dobili vsebnost lipofilnih ekstraktivov. Vsebnost proantocianidinov smo določili z UV-Vis spektrofotometrijo. Raziskava je pokazala, da imajo največjo vsebnost lipofilnih ekstraktivov vzorci poranitvenega dela, mrtve in žive grče. Najmanjšo vsebnost lipofilnih ekstraktivov smo izmerili v rdečem srcu. Največjo vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov smo našli v mrtvi in živi grči. Najmanjšo vsebnost pa smo izmerili v rdečem srcu. Največjo vsebnost celokupnih ekstraktibilnih snovi smo našli v živi grči, najmanjšo v rdečem srcu. Največjo vsebnost proantocianidinov imajo vzorci mrtve grče, sledijo vzorci žive grče. Najmanjšo vsebnost pa imajo ponovno vzorci rdečega srca. V vseh primerih, imajo vzorci rdečega srca najmanjšo vsebnost merjenih substanc.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1

DC UDC 630*813.2

CX *Fagus sylvatica*/extractives/proanthocyanidins/spectrophotometry

AU DEMŠAR, Davor

AA OVEN, Primož (supervisor)/POLJANŠEK Ida (co-supervisor)/PETRIČ, Marko (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, c.VIII/34

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Wood Science and Technology

PY 2015

TY ANALYSIS OF PROANTHOCYANIDINS CONTENT IN BEECH WOOD
USING A UV-VIS SPECTROPHOTOMETER

DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)

NO VIII, 50 p., 1 tab., 76 fig., 11 ref.

LA sl

Al sl/en

AB In this study we researched the content of proanthocyanidins in beech wood. The trees were cut down in the Kočevski Rog forest. We cut down the trees in a way that enabled us to get all necessary tissues for further research. At first, we cut the reels, which were then sawn, milled and dried. Next, we extracted the resulting samples, we performed two extractions. Firstly we performed the Soxhlet extraction, which enabled us to measure the content of all substances soluble in mixture of methanol and water, and the content of hydrophilic extracts. Next, we performed the diethyl ether extraction. This method enabled us to trace the lipophilic extracts. The content of proanthocyanidins was measured using the UV-Vis spectrophotometry. Our research showed that the highest amount of lipophilic extracts can be found in samples of wounded wood tissue, dead and alive tree knots. The lowest amount of lipophilic extracts was tracked in the red heart. The highest amount of hydrophilic extracts was again found in dead and alive tree knots, while the lowest was again found in the red heart. The highest content of total extractible substances were found in live knots, the lowest, again in red heart. We traced the highest amount of proanthocyanidins in dead tree knots, followed by alive tree knots. The lowest content of proanthocyanidins was found in the red heart. In all cases the samples of the red heart had the lowest amount of traced substances.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATIONS	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VII

1	UVOD	1
2	PREGLED OBJAV	2
2.1	OPIS BUKVE	2
2.2	OPIS LESA BUKVE	2
2.3	NASTANEK DISKOLORIRANEGA LESA PRI BUKVI	3
2.4	ODZIV LESA NA POŠKODBO	4
2.5	EKSTRAKTIVI	5
2.5.1	Maščobe in voski	7
2.6	PROANTOCIANIDINI	8
3	MATERIALI IN METODE	10
3.1	PREIZKUSNA DREVESA IN ODVZEM VZORCEV	10
3.2	RAZREZ KOLUTOV	10
3.3	MLETJE VZORCEV	10
3.4	DOLOČITEV SUHE SNOVI	10
3.5	SOXHLETOVA EKSTRAKCIJA	11
3.5.1	Izvedba ekstrakcije	12
3.6	DELEŽ V METANOLU TOPNIH SNOVI	15
3.7	DELEŽ CELOKUPNIH HIDROFILNIH EKSTRAKTIVOV	15
3.8	EVAPORIRANJE VZORCEV	15
3.9	DELEŽ CELOKUPNIH LIPOFILNIH EKSTRAKTIVOV	16
3.10	UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJA	19
3.10.1	Beer – Lambertov zakon	19
3.10.2	Določitev deleža proantocianidinov	20
3.11	IZRAČUNI	24
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	26
4.1	VSEBNOST LIPOFILNIH EKSTRAKTIVOV	26
4.2	VSEBNOST CELOKUPNIH HIDROFILNIH EKSTRAKTIVOV	31
4.3	DELEŽ CELOKUPNIH EKSTRAKTIVOV V POSAMEZNIH DREVESIH	36
4.4	VSEBNOST PROANTOCIANIDINOV V POSAMEZNIH DREVESIH	42
5	SKLEPI	47
6	POVZETEK.....	48
7	VIRI.....	50

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Proantocianidini - pogoste monomerne enote in polimerna nomenklatura	8

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Omejitev razkroja v drevesu po modelu CODIT (Oven 2001)	5
Slika 2: Variabilnost vsebnosti ekstraktivov v drevesu (1-vsi ekstraktivi, 2-trigliceridi, 3-smolne kisline, 4-maščobne kisline, 5-pinosilvin+mono-metil-eter) (Sjöström, 1993).....	6
Slika 3: Značilen flavonoid v lesu bukve je katehin	8
Slika 4: Galokatehin je gradnik prodelinidinov	8
Slika 5: Tehnica Mettler Toledo XS	11
Slika 6: Delovanje Soxhletovega aparata (Classic Kit: Soxhlet extractor, 2015).....	12
Slika 7: Označen celulozni tulec v Soxhletovem aparatu	12
Slika 8: Ekstrahirajoči vzorci (Termo blok 6 – večpozicijsko grelna mesto).....	13
Slika 9: Obarvano topilo med ekstrakcijo	13
Slika 10: Označena steklenička, kamor smo prelili 50 ml MeOH/H ₂ O ekstrakta.....	14
Slika 11: Označena steklenička, kamor smo odpipetirali 25 ml MeOH/H ₂ O ekstrakta.....	14
Slika 12: Označene epruvetke, kamor smo pipetirali MeOH/H ₂ O ekstrakt	14
Slika 13: Podtlak naprave nastavljen na 40 mbar	15
Slika 14: Vzorci, ki se evaporirajo	16
Slika 15: Kisanje vzorcev na želeni pH = 2 ± 0,5	17
Slika 16: Digestorij, kjer smo izvajali dietilno ekstrakcijo	18
Slika 17: Lij ločnik.....	18
Slika 18: Vanilin	20
Slika 19: Barvni reagent.....	20
Slika 20: Osnovna raztopina katehina in slepi vzorec	21
Slika 21: Vzorci, ki so pripravljeni za pipetiranje.....	22
Slika 22: Ledena kopel z vzorci	22
Slika 23: Barvna lestvica vzorcev (po inkubacijski dobi).....	23
Slika 24: UV-Vis spektrofotometer	23
Slika 25: Vsebnost lipofilnih ekstraktivov v drevesu številka 3	26
Slika 26: Povprečna vsebnost lipofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 3.....	26
Slika 27: Vsebnost lipofilnih ekstraktivov v drevesu številka 4	27
Slika 28: Povprečna vsebnost lipofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 4.....	27
Slika 29: Vsebnost lipofilnih ekstraktivov v drevesu številka 5	27
Slika 30: Povprečna vsebnost lipofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 5.....	28
Slika 31: Vsebnost lipofilnih ekstraktivov v drevesu številka 6	28
Slika 32: Povprečna vsebnost lipofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 6.....	28
Slika 33: Vsebnost lipofilnih ekstraktivov v drevesu številka 7	29
Slika 34: Povprečna vsebnost lipofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 7.....	29
Slika 35: Vsebnost lipofilnih ekstraktivov v drevesu številka 9	29
Slika 36: Povprečna vsebnost lipofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 9.....	30
Slika 37: Povprečna vsebnost lipofilnih ekstraktivov v vseh drevesih	30
Slika 38: Vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov v drevesu številka 3	31
Slika 39: Povprečna vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 3.....	31
Slika 40: Vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov v drevesu številka 4	32
Slika 41: Povprečna vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 4.....	32
Slika 42: Vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov v drevesu številka 5	32
Slika 43: Povprečna vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 5.....	33
Slika 44: Vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov v drevesu številka 6	33

Slika 45: Povprečna vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 6.....	33
Slika 46: Vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov v drevesu številka 7	34
Slika 47: Povprečna vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 7.....	34
Slika 48: Vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov v drevesu številka 9	34
Slika 49: Povprečna vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 9.....	35
Slika 50: Povprečna vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov v vseh drevesih	35
Slika 51: Delež ekstraktivov v drevesu številka 3	36
Slika 52: Povprečni delež ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 3	36
Slika 53: Delež ekstraktivov v drevesu številka 4	37
Slika 54: Povprečni delež ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 4.....	37
Slika 55: Delež ekstraktivov v drevesu številka 5	38
Slika 56: Povprečni delež ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 5	38
Slika 57: Delež ekstraktivov v drevesu številka 6	38
Slika 58: Povprečni delež ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 6.....	39
Slika 59: Delež ekstraktivov v drevesu številka 7	39
Slika 60: Povprečni delež ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 7.....	40
Slika 61: Delež ekstraktivov v drevesu številka 9	40
Slika 62: Povprečni delež ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 9.....	41
Slika 63: Povprečna vsebnost celokupnih ekstraktibilnih snovi za vsa drvesa.....	41
Slika 64: Vsebnost proantocianidinov v drevesu številka 3.....	42
Slika 65: Povprečna vsebnost proantocianidinov po tkivih v drevesu številka 3	42
Slika 66: Vsebnost proantocianidinov v drevesu številka 4.....	42
Slika 67: Povprečna vsebnost proantocianidinov po tkivih v drevesu številka 4	43
Slika 68: Vsebnost proantocianidinov v drevesu številka 5.....	43
Slika 69: Povprečna vsebnost proantocianidinov po tkivih v drevesu številka 5	43
Slika 70: Vsebnost proantocianidinov v drevesu številka 6.....	44
Slika 71: Povprečna vsebnost proantocianidinov po tkivih v drevesu številka 6	44
Slika 72: Vsebnost proantocianidinov v drevesu številka 7.....	44
Slika 73: Povprečna vsebnost proantocianidinov po tkivih v drevesu številka 7	45
Slika 74: Vsebnost proantocianidinov v drevesu številka 9.....	45
Slika 75: Povprečna vsebnost proantocianidinov po tkivih v drevesu številka 9	45
Slika 76: Povprečna vsebnost proantocianidinov v vseh drevesih.....	46

1 UVOD

Les nas spremlja povsod, na vsakem koraku. Je človeku zelo prijazen material in si preprosto ne moremo predstavljati življenja brez njega. Da pa lahko optimalno uporabljamo vse njegove lastnosti, moramo zelo dobro poznati njegovo zgradbo. Les je zelo variabilen material, kar je posledica vzajemnega učinka makroskopskih morfoloških posebnosti lesa (prepletanje različnih tkiv: juvenilni les, adultni les, grče, reakcijski les, ...), anatomije (različne vrste celic, njihov delež v tkivu, ...), ultrastrukture (plastovitost celične stene) in kemijske sestave (sestavine celičnih sten, njihova medsebojna povezanost, ...). (Oven in sod., 2009). Zaradi svoje zgradbe se les močno razlikuje od ostalih gradbenih materialov.

Kemijske snovi v lesu lahko razdelimo na osnovi molekulske mase. Imamo snovi z veliko molekulsko maso in snovi z majhno molekulsko maso. Kemijske snovi pa lahko razdelimo tudi topografsko, in sicer na strukturne in nestrukturne komponente. Strukturne komponente določajo obliko celic in tudi večino fizikalnih in mehanskih lastnosti lesa. Strukturne snovi so gradniki celične stene. Nestrukturne komponente pa se nahajajo v medceličnih prostorih, celičnih lumnih in v praznih prostorih v celični steni. Označujemo jih tudi z izrazom ekstraktivi (Oven in sod., 2009).

Ekstraktivi v lesu niso enakomerno razporejeni. Ponedkod najdemo več ekstraktivov, ponekod manj. Pri mnogih drevesnih vrstah, je v grčah prisotnih več ekstraktivov kot v jedrovini ali beljavi. V diplomski nalogi bomo raziskali, v katerem delu bukve je prisotnih največ proantocianidinov.

Cilji diplomske naloge so:

- določiti vsebnost proantocianidinov v normalnem in poškodovanem lesu bukve
- določiti vsebnost vseh ekstraktibilnih snovi
- določiti vsebnost lipofilnih snovi
- določiti vsebnost hidrofilnih snovi

V raziskavi smo izhajali iz naslednjih delovnih hipotez:

- v reakcijskih conah je več proantocianidinov kot v okoliškem diskoloriranem lesu
- v beljavi proantocianidinov ni
- variabilnost vsebnosti proantocianidinov v posameznih lesnih tkivih je med drevesi z istega rastišča statistično značilna

2 PREGLED OBJAV

2.1 OPIS BUKVE

Opis povzet po Brus (2005). Bukev zraste do višine 40 metrov in ima premer debla do enega metra. Je listopadno drevo z veliko zaobljeno krošnjo. Koreninski sistem je zelo gosto srčast, srednje globok in razvejen. Na rastiščih, kjer so tla globoka in sveža, sega do 1,4 m globoko, kjer pa so tla zbita in slabo zračna, pa je plitek. Korenine so pogosto zraščene med seboj. Glavna korenina kmalu preneha z rastjo. Bukev dosega tudi zelo velike mere, v Sloveniji ima najdebelejša bukev obseg 624 cm ter je visoka 34 m (Brus 2005). Za bukev je značilno ravno deblo, ki je včasih razvito do vrha krošnje. Skorja je siva, tanka in gladka, le včasih je v spodnjem delu razpokana. Zelo pogosti so približno za prst debeli izrastki, ki jih najdemo na skorji. To so zakrneli brsti, ki se niso razvili v normalne veje. Veje so razmeroma tanke in pogosto usmerjene navzgor. Listi bukve so 6–10 cm dolgi, ter 3–7 cm široki, so kratkopecljati in jeseni odpadejo. Na zgornji strani so bolj temno zeleni in se bleščijo, na spodnji strani pa so svetlejši. V mladosti so listi dlakavi, pozneje pa so dlakavi le po listnem robu. Bukev na začetku raste zelo počasi, do 20 leta zraste do 3 m. V poznejših letih, pa si izbori več svetlobe in posledično raste hitreje. Svojo maksimalno višino doseže okrog 100. leta. Doživi približno 200–300 let (Brus 2005). Bukev najlepše uspeva na svežih in globokih, rahlih in odcednih humoznih tleh, ki so bogata s kalcijem. Glede matične podlage ni zahtevna, saj uspeva tako na bazični kot na kisli. Za rast so neugodna rastišča, kjer so tla plitva, peščena, revna, težko ilovnata ali močvirnata. Glede količine talne in zračne vlage je primerljiva s smreko in jelko, saj jo potrebuje veliko. V krajih, kjer je letno manj kot 600 mm letnih padavin, bukev ne uspeva. Za uspešno rast potrebuje vsaj 5-mesečno vegetacijsko dobo z obilo toplote. Zelo ji ustreza tudi vlažno podnebje z dovolj padavinami, ki so enakomerno razporejene čez rastno dobo. Zimski mraz sorazmerno dobro prenaša, medtem ko daljšo sušo slabo prenaša. Zelo pomembno za bukev je, da sestoj ne odpremo prehitro, saj je občutljiva na sončno pripeko. Je sencozdržna, kar se vidi v sestojih, ki so gosto sklenjeni. Drevesa bolje rastejo v sestoju kot na prostem. Zelo pomembno pri bukvi je, da se uspešno pomlajuje tudi v senci lastnih sestojev. Mlada drevesca skoraj ne priraščajo cela desetletja, ko pa se pojavijo boljše razmere, takoj pospešijo svojo rast. Poleg ekološke prilagodljivosti ji ta lastnost daje izjemno konkurenčno moč. Sneg in žled dobro prenaša, medtem ko zaradi plitkega koreninskega sistema ni tako odporna proti vetru (Brus, 2005).

2.2 OPIS LESA BUKVE

Povzeto po Čufar (2006). Les bukve je rdečkasto bele barve. Ob normalnih pogojih se beljava in jedrovina ne ločita. Zelo pogosto pri bukvi najdemo diskoloriran les imenovan »rdeče srce«. Najpogosteje to najdemo pri starejših drevesih. Traheje so v lesu bukve razporejene difuzno, pri »rdečem srcu« močno otiljene, zato je impregnacija takega lesa zelo težka. Premer trahej (tangencialni) je približno 100 μm . (Čufar 2006). Na prečnem prerezu lahko traheje vidimo z lupo. V kasnem lesu najdemo manj trahej, ki so tudi nekoliko manjše. Kasni les je tudi nekoliko temnejši od ranega. V bukvi najdemo trakove dveh vrst. Najdemo 2 do 4 redne, ki so nizki. Drugi pa so nad 10 redni in so visoki nad 1

mm. Trakovi, so na tangencialni površini vidna kot rdečkasta vretenca. Na radialni strani pa jih opazimo kot zrcalca, ki so visoka do več milimetrov. Bukovina je na splošno brez posebnega vonja (Čufar 2006).

2.3 NASTANEK DISKOLORIRANEGA LESA PRI BUKVI

Povzeto po Torelli (2003). Genetsko fiksiran proces, pri katerem se beljava transformira v jedrovino, imenujemo ojedritev. Proces je vrstno specifičen, tako v fiziološkem kot v kemičnem pogledu. Vrste, ki ne ojedrijo, imenujemo »beljavci«. Pri »beljavcih« predvsem dehidracija prevzame vlogo eliminacije starejših tkiv in s tem optimalno dimenzioniranje beljave. Kot rezultat tega je vidna sušina ali zrečina. Transformacija žive skorje v mrtvo, je analogen pojav. Vendar gre tukaj za »tipično abscisijo«, ki jo spremlja nastanek sekundarnega meristema felogena in »abscisirajočega« suberiziranega felema (Torelli, 2003).

Mednarodno združenje lesnih anatomov IAWA (1964) je definiralo jedrovino kot »notranje plasti lesa v rastočem drevesu, kjer je parenhim odmrli, rezervne snovi (npr. škrob) v njem pa so se odstranile ali transformirale v jedrovinske snovi«. Definicija ne obravnava jedrovine kot programiranega, genetsko fiksanega procesa in pušča nekaj nejasnosti (Torelli, 2003).

Diskoloriran les ima praviloma povišano vlažnost. Topolov diskolorirani les lahko zato imenujemo mokro srce ali pa rjavo srce – odvisno od tega, katero lastnost želimo poudariti. Z mokrim srcem označujemo pri jelki mokrino, ki se razvije na lokaciji suhe, neobarvane jedrovine. Vprašanje je le, ali je praksa s srcem hotela označiti predvsem njegovo obarvanost (rdeče srce) ali pa njegovo visoko vlažnost (mokro srce pri jelki ali topolu). Uvedba izraza diskoloriran les vsaj začasno rešuje problem Bosshardovih ohlapnih kategorij upočasnjena (zadržana) ojedritev in fakultativno obarvana jedrovina. Tako šteje Bosshard (Bosshard, 1982, cit. po Torelli, 2003) jelšo med vrste z upočasnjeno ojedritvijo, ki priložnostno tvori fakultativno obarvano jedrovino. Beli gaber naj bi bila vrsta z upočasnjeno ojedritvijo in brez tvorbe fakultativno obarvane jedrovine. Bukev naj bi bila vrsta s fakultativno obarvano jedrovino (Torelli, 2003).

Pri razvpitem rdečem srcu potemtakem ne gre za obarvano jedrovino ali črnjavo, temveč za diskoloriran les, ki ga je povzročilo encimsko rjavenje predhodno fiziološko dehidrirane sredice. Rdeče srce nastaja v dveh fazah, ki sta lahko časovno močno oddaljeni ali pa si tekoče sledita. Uvodna ali dehidracijska faza je povsem naraven fiziološki pojav in je odvisen od globine krošnje, višine in debeline debla, medtem ko je diskoloracijska faza izrazito fakultativna in je posledica vdora atmosferskega kisika v dehidrirano sredico (Torelli, 1984).

K ojedritveni terminologiji sodita še izraza prehodna cona in intermediarni les. Prehodna cona med jedrovino in beljavo ali diskoloriranim lesom in beljavo je »ozka, svetlejša cona, ki obdaja nekatere jedrovine ali poškodovane regije, često z živimi celicami, navadno brez škroba, pogosto nepermeabilna za kapljevine, z vlažnostjo, nižjo od beljave in včasih od jedrovine« (Hillis, 1987, str. 16, cit. po Torelli, 2003). To cono včasih označujejo kot »belo

cono« (Nobushi in Harada, 1983, cit. po Torelli, 2003), sicer pa splošno kot »suho cono« (Torelli, 2003).

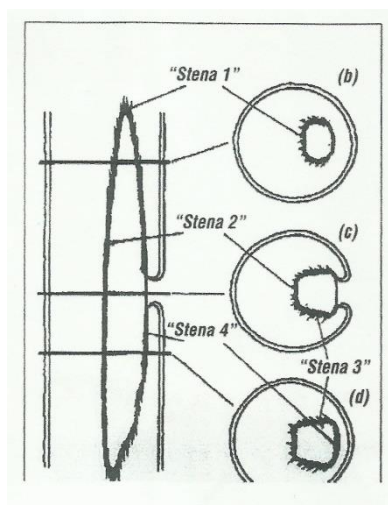
2.4 ODZIV LESA NA POŠKODBO

Vrasla skorja in ostale nezaželene rastne posebnosti so ene od krivcev za lome vej. Glavni krivec za lomljenje vej pa so obsežni razkrojni procesi v drevesnih tkivih. Vemo, da ima les tudi oporno vlogo, toda to vlogo lahko izpolnjuje le, če je povsem zdrav. Mehanske poškodbe drevesa so nekaj povsem običajnega. Največkrat je za mehanske poškodbe odgovoren prav človek. Lahko pa jih povzroči tudi veliko drugih dejavnikov (veter, divjad, sneg, strele, ...) Človek pogosto s svojo malomarnostjo pri opravih poškoduje drevesa (gradnja gozdnih poti, sečnja, spravilo hlodovine, ...). Veliko bolj pogoste pa so mehanske poškodbe mestnega drevja (trki vozil, površna košnja, vandalizem, ...). Pri mestnem drevju je pogosta poškodba koreninskega sistema (gradnja cest, pločnikov, vodovodna dela, ...). Za mehansko poškodbo krošenj pa so glavni vzroki neurja, površno obžagovanje, strele, ...

Model omejitve razkroja v drevesu CODIT (Compartmentalization of Decay In Trees) (Shigo in Marx 1977, cit. po Oven, 2001) ima dva dela. Prvi del pojasnjuje časovno zaporedje sprememb v tkivu po poškodovanju, drugi del modela je prostorski in v drevesu predpostavlja ovire, ki omejujejo širjenje in razvoj razkrojnih procesov (Shigo in Marx, 1977, cit. po Oven, 2001).

Časovni model CODIT-a je sestavljen iz treh faz, ki si zaporedno sledijo. 1 stopnja sledi takoj po mehanski poškodbi. Proces, ki so prisotni v 1 fazi, so: izsuševanje, vdor kisika v prevodne elemente in abiotske spremembe. V naslednji fazi pride do kolonizacije poškodovanega lesa. Namesto primarnega metabolizma celic nastopi sekundarni metabolizem. V zadnji fazi pa pride do razkroja lesa, kar povzroči, da les izgubi oporno funkcijo.

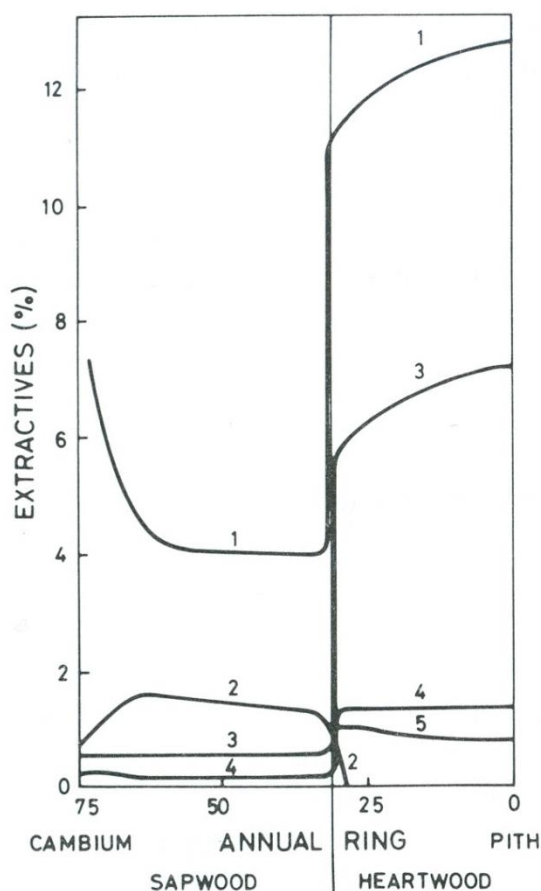
Drugi del metode CODIT predstavlja prostorski razvoj razkroja. Model predpostavlja, da poškodbe v lesu omejujejo štiri modelne stene. Širjenje okužbe in diskoloracije v vzdolžni smeri omejuje 1.stena. Sestavljena je iz osnih elementov (depoziti gume, tile, pri iglavcih zasmoljevanje traheid). Širjenje v centripetalni smeri zavira gosta plast kasnega lesa, kar predstavlja 2.steno. 3.stena zavira širjenje v tangencialni smeri. Sestavljena je iz radialnega trakovnega tkiva. Zadnji in hkrati najbolj pomemben element modela je stena 4. Steno 4 imenujemo tudi barierna cona in je sestavljena iz kambija po ranitvi.



Slika 1: Omejitev razkroja v drevesu po modelu CODIT (Oven 2001)

2.5 EKSTRAKTIVI

Veliko različnih lesnih komponent, čeprav običajno predstavljajo le majhen delež, je topnih v nevtralnih organskih topilih in v vodi (Sjöström, 1993). To so tako imenovani ekstraktivi, ki predstavljajo ogromno število posameznih spojin, tako lipofilnih, kot hidrofilnih in jih lahko štejemo kot nestrukturane lesne sestavine, sestavljene skoraj izključno iz ekstracelularnih spojin ter iz spojin z nizko molekulsko maso. Podobne sestavine se pojavijo v tako imenovanih izcedkih, ki jih tvori drevo preko sekundarnega metabolizma po mehanski poškodbi ali po napadu insektov oziroma gliv. Čeprav obstajajo podobnosti med lesnimi ekstraktivi znotraj družine drevesa, pa vendarle obstajajo razlike v sestavi ekstraktivov, tudi med tesno povezanimi vrstami lesa. Kot pravilo se različni deli lesa (deblo, veje, korenine, lubje, iglice) razlikujejo tako po količini kot po sestavi ekstraktivov. Bor na primer vsebuje veliko več ekstraktivov v jedrovini kot pa v beljavi (Sjöström, 1993).



Slika 2: Variabilnost vsebnosti ekstraktivov v drevesu (1-vsi ekstraktivi, 2-trigliceridi, 3-smolne kisline, 4-maščobne kisline, 5-pinosilvin+mono-metil-eter) (Sjöström, 1993).

Ekstraktivi zasedajo določena mesta v strukturi lesa. Smolne kisline se na primer nahajajo v smolnih kanalih, kjer so prisotne maščobe in voski. Fenolni ekstraktivi so prisotni predvsem v jedrovini in lubju (Sjöström, 1993).

Različne vrste ekstraktivov so nujno potrebne za ohranitev raznolikih bioloških funkcij v drevesu. Maščobe predstavljajo vir energije lesnim celicam, medtem ko nižji terpenoidi, smolne kisline in fenolne spojine ščitijo les pred mikrobiološkimi poškodbami ter napadi insektov. Sledi določenih kovinskih ionov so pogosto prisotne kot funkcionalen del encimov, ki so potrebni kot katalizatorji pri biosintezi (Sjöström, 1993).

Čeprav to ni zelo natančno, je izraz »smola« pogosto uporabljena kot skupno ime za lipofilne ekstraktive (z izjemo fenolnih snovi), ki so topni v nepolarnih organskih topilih, vendar netopni v vodi (Sjöström, 1993). Količinsko določanje ekstraktivov v drevesu in celulozi izvedemo s standardnimi metodami. To je ekstrakcija, ki jo izvajamo z organskimi topili, kot so heksan, diklorometan, dietil-eter, aceton ali etanol. Vsebnost ekstraktivov je običajno manjša od 10 %, vendar pa se lahko v posameznih delih močno razlikuje ter naraste do 40 % suhe mase lesa. Za analitske namene ter za identifikacijo posameznih komponent pa uporabljamo plinske ali tekočinske kromatografske metode v kombinaciji z masno spektrometrijo (Sjöström, 1993).

Običajno les ne vsebuje veliko vodotopnih snovi, tudi pri nekaterih vrstah, kjer so prisotne velike količine taninov in arabinogalaktanov, ne. Vendar so arabinogalaktani hemicelulozne sestavine in se ne štejejo med ekstraktive. Ekstraktivi so pomembni ne samo za razumevanje taksonomije in biokemije dreves, temveč tudi pri upoštevanju tehnoloških vidikov. Ekstraktivi predstavljajo dragoceno surovino za izdelavo organskih kemikalij in igrajo pomembno vlogo pri mletju in pri izdelavi papirja (Sjöström, 1993).

2.5.1 Maščobe in voski

Maščobe in voski so prevladujoče sestavine lipofilnih snovi, ki se nahajajo v parenhimskih celicah (Sjöström, 1993). Z izrazom smola označujemo tako spojine, ki se nahajajo v parenhimskih celicah, kot tudi tiste, ki se nahajajo v smolnih kanalih. Kemična sestava parenhimske smole je drugačna od oleinske smole. V lesu iglavcev je parenhimska smola v glavnem sestavljena iz maščob. Več kot 95 % parenhimskih celic v lesu iglavcev se nahaja v lesnih trakovih. V smrekovini parenhimske celice predstavljajo večino trakovnih celic, medtem ko pri borovcih prevladujejo traheide. Če zmeljemo smrekovino, večino smole ostane vdlane znotraj toge parenhimske celične stene. Odstranitev trakovnih celic z mehansko frakcijo je torej učinkovit postopek za zmanjšanje vsebnosti ekstraktivov lesa smrekovine na sprejemljivo raven (Sjöström, 1993).

Pri lesu listavcev je parenhimska smola praktično edina vrsta smole. Poleg maščobe so voski obilne smolne komponente. Odstranitev smole iz listavcev med mletjem je odvisna tudi od dimenzij por in od mehanskih stabilnosti parenhimskih celic. V teh pogledih obstajajo velike razlike med listavci. Pore v brezovih in javorjevih parenhimskih celicah so ozke, medtem ko so pri bukvi, hrastu veliko večje (Sjöström, 1993).

Maščobe so estri glicerola in višjih maščobnih kislin, ki se pojavljajo v lesu pretežno kot trigliceridi. V svežem lesu so maščobne kisline prisotne praktično samo v strženu. Maščobne kisline se delno ločijo od trigliceridov med skladiščenjem lesa. V lesu iglavcev in lesu listavcev je bilo identificiranih več kot 30 maščobnih kislin, tako nasičenih kot nenasičenih. Med nenasičenimi C18-maščobnimi kislinami prevladujejo oleinske kisline (maščobne kisline z eno dvojno vezjo) in linolejske kisline (maščobne kisline z dvema dvojnima vezema). Od trioleinskih kislin je najbolj pogosta linolenska kislina, čeprav je prisotna v zelo majhnem deležu tako pri iglavcih kot pri listavcih. Njen izomer, pinolenska kislina, je glavna maščobna kislina pri borih in smrekah. Eikosatrienojska kislina (C20:3) je tudi zelo pogosta maščobna kislina pri iglavcih (Sjöström, 1993).

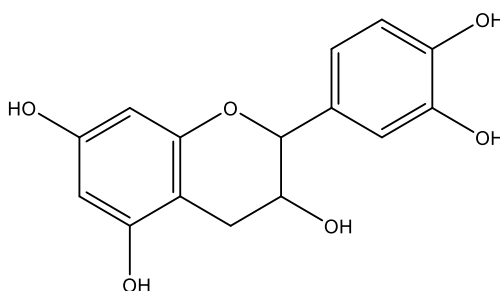
Voski so estri višjih maščobnih kislin z visokomolekularnimi enovalentnimi alkoholi. Ostale voskaste komponente so v glavnem sestavljene iz prostih maščobnih alkoholov, med katerimi prevladujejo aracinol (C20), behenol (C22) in lignocerol (C24) (Sjöström, 1993).

2.6 PROANTOCIANIDINI

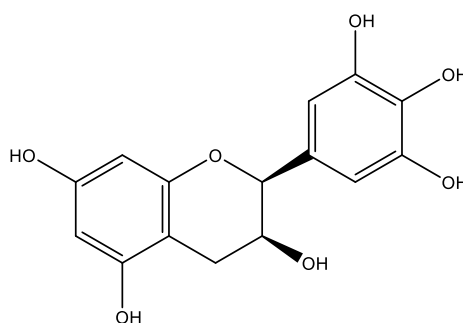
Proantocianidini predstavljajo pomembno skupino fenolnih spojin, ki se pojavljajo v lesenih in nekaterih zelnatih rastlinah. Levkocianidini so definirani kot monomerni flavonoidi (flavan-3,4-dioli in flavan-4-oli), ki proizvajajo antocianidine s cepitvijo vezi C-O pri segrevanju z mineralno kislino. Proantocianidini so flavan-3-ol oligomeri, ki proizvajajo antocianidine s cepitvijo C-C interflavanske vezi ob močno kislih pogojih (Porter, 1992).

Preglednica 1: Proantocianidini - pogoste monomerne enote in polimerna nomenklatura

<i>MONOMER</i>	<i>POLIMER</i>
Fisetinidol	Profisetinidin
Robinetinidol	Prorobinetinidin
Katehin	Procianidin
Epikatehin	Procianidin
Galokatehin	Prodelfinidin
Epigalokatehin	Prodelfinidin



Slika 3: Značilen flavonoid v lesu bukve je katehin



Slika 4: Galokatehin je gradnik prodelfinidinov

Proantocianidini so oligomeri in polimeri sestavljeni iz verig polihidroksiflavanskih enot (Porter, 1992). Najbolj pogoste monomerne enote so hidroksilirane pri C3 in so navedene v preglednici 1. Monomerne enote so pretežno vezane s 4-6 ali 4-8 med-flavonoidnimi vezmi. To povzema sedanje znanje o proantocianidin polimernih strukturi, kjer so 4-8 vezi bolj pogoste kot 4-6 vezi (Porter, 1992).

Čeprav prejšnje raziskave, ki jih je opravil Haslam, razpravljajo o številnih problemih, ki nastanejo zaradi sistematske klasifikacije in nomenklature proantocianidinov, se zdi koristno ponoviti opredelitev pojma proantocianidin, ki sta ga prvotno ugotovila Freudenberg in Weinges: proantocianidini so vse brezbarvne snovi izolirane iz rastlin, ki smo jih tretirali s kislinami, in tvorijo antocianidine. Tako levkoantocianidini (zdaj omejeni na flavan-3,4 diol), kondenzirani tanini ali katerikoli drugi brezbarvni flavonoidni derivati, ki proizvajajo antocianidine pri termični obdelavi s kislino, morajo biti združeni pod to skupino spojin (Porter, 1992).

Proantocianidini se nadalje razvrstijo na podlagi njihovega hidroksilacijskega vzorca. Propelargonidin (11), procianidin (12) in prodelfinidin (13) so torej imenovani po antocianidinih, ki nastanejo pri tretiranju s kislino. Medtem ko so njihovi 5-deoksi analogi, proguibourtinidini (14), profisetinidini (15) in prorobinetinidini (16) imenovani po njihovih ustreznih flavan-3,4-dioli (Porter, 1992). Ker sedaj poznamo mešane proantocianidine (vsebujejo tako katehin kot galokatehin), bo ta sistem lahko kmalu postal neprimeren za uporabo (Porter, 1992).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PREIZKUSNA DREVESA IN ODVZEM VZORCEV

Drevesa smo izbrali in posekali v Kočevskem Rogu, v bližini Podturna pri Dolenjskih toplicah. Vzorčenje je potekalo v gozdni enoti s površino 15 ha na nadmorski višini 500 m–600 m. Vegetacija je bila dinarsko jelovo bukovje s primesjo smreke in javorja. Starost sestojev je bila okrog 140 let (Vek, 2013).

Izbrali smo drevesa, ki so imela vidno mehansko poškodbo in za katera smo ocenjevali, da imajo v osrednjem delu debla že razvito rdeče srce. Drevesa so zato imela relativno kratko krošnjo in tudi vidne štrele odlomljenih vej. Drevesa smo posekali 22. septembra 2011. Iz vsakega drevesa smo v krošnji izžagali del, ki je vseboval žive in mrtve veje, vzdolž debla pa smo izžagali po dva koluta debeline 10 cm (Vek, 2013). Prvi je bil odvzet na bazi, kjer je bilo drevo mehansko poškodovano. Ta kolut je torej vseboval vsa tkiva, ki nastanejo kot posledica mehanske poškodbe. Drugi kolut smo odvzeli na višini približno 14 m. Ta kolut je vseboval tipično rdeče srce. Kolute smo pripeljali na Oddelek za lesarstvo in jih razžagali v mizarški delavnici (Vek, 2013).

3.2 RAZREZ KOLUTOV

Vse kolute smo najprej poskobljali in dokumentirali, zatem smo si skrbno ogledali vse makroskopske posebnosti in na kolutih označili položaje bodočih vzorcev. Na spodnjem kolutu smo izžagali vzorce ranitvenega lesa, beljave, diskoloriranega lesa in reakcijske cone. Na zgornjem kolutu pa smo izžagovali vzorec beljave, reakcijske cone in diskoloriranega lesa. Žive in mrtve grče smo obdelali tako, da smo v največji možni meri izločili tkivo debla (Vek, 2013).

3.3 MLETJE VZORCEV

Razžagane vzorce smo najprej posušili, nato pa zmeli z laboratorijskim mlinom Retsch SM 2000, pri čemer smo pazili, da vzorcev nismo mešali ali jih kakorkoli drugače onesnažili. Zato smo po vsakem zmletem vzorcu mlin skrbno očistili. Vzorce smo nato prenesli v laboratorij za kemijo lesa in jih pripravili za nadaljnje postopke (Vek, 2013).

3.4 DOLOČITEV SUHE SNOVI

Najprej smo bukovini morali določiti suho snov. To smo storili z gravimetrično metodo, ki poteka tako, da smo za vsak vzorec na papir zatehtali 1g žagovine. Tehtanje poteka tako, da na listek papirja nasujemo 1g vzorca. V pomoč nam je bil čopič, da smo odvečni del lahko precizno odstranili. Za vsak vzorec smo uporabili nov papir. Tehtali smo na 4 decimalke natančno. Za tehtanje smo uporabili analitsko tehtnico Mettler Toledo XS (slika 5).



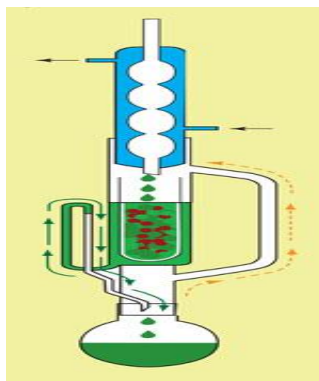
Slika 5: Tehnica Mettler Toledo XS

Ko smo vzorec stekali, smo ga stresli v tehtič. Vsak tehtič posebej smo označili s številko vzorca. Tehtiče smo pred uporabo posušili v sušilniku, in sicer pri 105 °C, 30 minut. Potem smo jih z vzorci dali v sušilnik ter jih sušili pri 105 °C. Po enem dnevu sušenja smo tehtiče vzeli iz sušilnika ter jih za eno uro postavili v eksikator. Potem smo vzorce ponovno stekali ter tako lahko določili delež suhe snovi, ki se podaja v %.

3.5 SOXHLETOVA EKSTRAKCIJA

Naprava, katero smo uporabili za ekstrahiranje naših vzorcev, se imenuje Soxhletov ekstraktor. Napravo je leta 1879 izumil Franz Von Soxhlet. Njegova prva funkcija je bila namenjena za izločanje lipidov iz trdnega materiala, vendar pa je naprava namenjena tudi za druge vrste ekstrakcije. Če se spojina iz trdne zmesi v danem topilu raztaplja, se vanj ekstrahira. Pogoji je, da je mnogo bolj topna v dodatnem topilu kot ostale sestavine zmesi. Na ta način lahko ločimo organske spojine od anorganskih soli.

Delovanje Soxhletovega ekstraktorja poteka tako, da v bučko nalijemo topilo, ki ga bomo uporabljali. Bučko nato segrevamo pri določeni temperaturi. Topilo začne izhlapevati. Pare topila, se kondenzirajo v vodnem hladilniku in začnejo kapljati na vzorec. Vzorec postavimo v celulozni tulec, ki je pokrit z vato. Ko topilo kaplja na vzorec, se iz njega izpirajo topne snovi, katere nas zanimajo. Ko se topilo napolni do višine odtoka, topilo steče nazaj v bučko po principu natege. To imenujemo cikel. Za uspešno ekstrakcijo, moramo cikel večkrat ponoviti.



Slika 6: Delovanje Soxhletovega aparata (Classic Kit: Soxhlet extractor, 2015)

3.5.1 Izvedba ekstrakcije

Za izvedbo ekstrakcije po Soxhletu smo uporabili celulozne tulce (slika 7), ki smo jih posebej označili s številko vzorca. Na voljo smo imeli 12 Soxhletovih aparatov, tako da smo za eno serijo pripravili 12 tulcev. Vsak tulec smo nato nežno zamašili z vato in jih nato sušili 24 ur pri 105 °C. Po enodnevnem sušenju smo tulce vzeli iz sušilnika ter jih za 30 minut postavili v eksikator. Ohlajene, absolutno suhe tulce smo nato stehali na 5 decimalk natančno. Maso smo zabeležili takoj, ko se je prvič umirila, saj je potem masa naraščala, ker je celulozni tulec nase vezal vlago. Potem smo v celulozne tulce natehtali vzorce. Natehtali smo 2,5 g vzorca, in sicer na 4 decimalke natančno. Za tehtanje smo uporabili navadne papirnate lističe. Za natančno pobiranje vzorca s papirja smo uporabili tudi čopič. Za vsak vzorec smo uporabili nov papir, da ne bi prišlo do mešanja vzorcev.



Slika 7: Označen celulozni tulec v Soxhletovem aparatu

Nato smo polne tulce z vzorci postavili v eksikator. Nato smo v bučke zamešali 250 ml topila (60 % MeOH). Topilo je bilo sestavljeno iz 150 ml MeOH + 100 ml destilirane vode. V bučko smo dodali tudi 3 vrelne kamenčke. Vrelni kamenčki pripomorejo, da topilo lepše vre. Ko smo imeli namešano topilo, smo sestavili Soxhletov aparat. Tulec smo postavili v ekstraktor, bučko s topilom pa smo postavili v termični blok. Postopek je potekal pri temperaturi 160 °C. Čas ekstrakcije je bil 6 ur.



Slika 8: Ekstrahirajoči vzorci (Termo blok 6 – večpozicijsko grelnο mesto)

Prvo uro ekstrakcij smo merili tudi čas enega cikla (od začetka kondenziranja do trenutka, ko topilo steče nazaj v bučko). Časi ciklov so se med seboj nekoliko razlikovali. V eni uri je bilo narejenih približno 6 ciklov. V prvem ciklu se je topilo močno obarvalo (slika 9).



Slika 9: Obarvano topilo med ekstrakcijo

Po končani ekstrakciji smo Soxhletov aparat razstavili. ekstrakt smo prelili:

- 50 ml smo ga prelili v temno stekleničko, ki je bila označena – ime drevesne vrste, številka vzorca, ime topila, datum (slika 10)
- 25 ml smo ga ročno pipetirali v 100 ml stekleničko (slika 11)
- 10 ml pa smo ga pipetirali v epruvetko (slika 12)



Slika 10: Označena steklenička, kamor smo prelili 50 ml MeOH/H₂O ekstrakta



Slika 11: Označena steklenička, kamor smo odpipetirali 25 ml MeOH/H₂O ekstrakta



Slika 12: Označene epruvetke, kamor smo pipetirali MeOH/H₂O ekstrakt

Ostalo topilo pa smo zlili med odpadna topila.

3.6 DELEŽ V METANOLU TOPNIH SNOVI

Delež v MeOH/H₂O topnih snovi, smo merili na dva načina. Pri 1. načinu smo uporabili tulce, ki smo jih po ekstrakciji sušili 24 ur v sušilniku pri 105 °C. Po enem dnevu sušenja smo tulce postavili v eksikator za 30 minut, jih vzeli ven in tehtali. S tem smo pridobili podatke o deležu celokupnih ekstraktibilnih snovi (glej izračuni). Rezultate smo izrazili v %.

3.7 DELEŽ CELOKUPNIH HIDROFILNIH EKSTRAKTIVOV

Za ugotavljanje deleža celokupnih hidrofilnih ekstraktivov smo uporabili epruvetke - 2. način (slika 12). Vse epruvetke smo najprej očistili, postavili v sušilnik, da so se posušile, nato pa vsako posebej tehtali ter označili s številko vzorca. Tehtali smo na 5 decimalk natančno. Nato smo v vsako epruvetko pipetirali po 10 ml topila (po ekstrakciji). Nato smo vse epruvetke postavili v sušilnik pri 80 °C, kjer smo jih pustili 3 dni. Po sušenju smo jih vzeli iz sušilnika ter jih postavili v eksikator za 30 minut, jih vzeli ven ter jih tehtali na 5 decimalk natančno. Tako smo pridobili podatek o deležu celokupnih hidrofilnih ekstraktivov. Ti podatki, so bili uporabljeni za analizo hidrofilnih ekstraktivov.

3.8 EVAPORIRANJE VZORCEV

Preden smo lahko določili delež celokupnih lipofilnih ekstraktivov in delež proantocianidinov, smo morali vzorce evaporirati. Z evaporiranjem odstranimo metanol in tako dobimo samo ekstraktive v vodni frakciji. Pri evaporiranju smo bili pozorni na parne tlake tako metanola kot vode. Potrebno je zagotoviti tak podtlak, da izpareva samo metanol, voda pa ne. Iz diagrama smo odčitali, da ima pri sobni temperaturi metanol parni tlak 133 mbar, vodni parni tlak pa 23 mbar (Vek 2010). Tako smo izbrali podtlak 40 mbar (slika 13).



Slika 13: Podtlak naprave nastavljen na 40 mbar



Slika 14: Vzorci, ki se evaporirajo

3.9 DELEŽ CELOKUPNIH LIPOFILNIH EKSTRAKTIVOV

Delež celokupnih lipofilnih ekstraktivov smo ugotavljali z dietilno ekstrakcijo. Najprej smo morali rotovapirane vzorce zakisati. To smo storili s 6M HCl (klorovodikova kislina). Priprava 6M HCl kisline je opisana v poglavju izračuni. Preden smo začeli s kisanjem, smo s pH metrom določili pH vzorcev, ki je pred kisanjem znašal okoli 6. Razlike med vzorci so bile majhne. Nato smo začeli z dodajanjem kisline. Vzorcem smo s 100 μ L pipeto počasi dodajali raztopino klorovodikove kisline, nakar je bilo potrebno ekstrakt dobro pretresti. Tako smo ekstrakte v vodni frakciji zakisali z vrednosti pH 5 – 6, na želeno pH $2 \pm 0,5$.



Slika 15: Kisanje vzorcev na želeni $\text{pH} = 2 \pm 0.5$

Po kisanju vzorcev je sledila ekstrakcija z dietiletrom. Za ekstrakcijo smo potrebovali železno stojalo, na katerega smo pritrdili 50 ml lij ločnik. Najprej smo v lij ločnik vlili zakisan vodni ekstrakt (vrednost $\text{pH} 2$), nato pa smo dodali 5 ml dietiletra. Delo je potekalo v digestoriju (slika 16), saj so topilo dietiletra uporabljali kot narkotik, ki je močno hlapen. Lij ločnik smo nato sneli s stojala ter ga dobro pretresli. Vzorec smo stresali dobre tri minute, vmes pa smo iz lija ločnika (s pomočjo ventila) spuščali plinsko fazo. Po dobrih treh minutah smo lij postavili nazaj na stojalo ter počakali, da se plasti ločita (slika 17).



Slika 16: Digestorij, kjer smo izvajali dietilno ekstrakcijo



Slika 17: Lij ločnik

Spodnja plast, ki je intenzivneje obarvana, predstavlja ekstrakt v vodni frakciji. Zgornja plast pa predstavlja ekstrakt topen v dietiletru. Spodnjo plast, smo s pomočjo lij ločnika odlili v 15 ml stekleničko. Nato pa smo v očiščeno ter stehtano stekleničko odlili še zgornjo plast (dietiletrski ekstrakt). Spodnjo plast smo nato ponovno vlili v lij ločnik, ter ponovno dodali dietileter. Postopek smo dvakrat ponovili. Tako smo skupno 3 krat dodali po 5 ml dietiletra.

3.10 UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJA

Povzeto po Lobnik (2010) se spektralna fotometrija uporablja za določevanje koncentracij v raztopinah, temelji pa na absorpciji svetlobe (UV, vidne) v raztopini. Če vemo, kateri del spektra absorbirajo iskani elementi oz. spojine, lahko iz količine absorbirane svetlobe (merjenje intenzivnosti svetlobe, ki je prodrla skozi vzorec) ugotovimo njihovo koncentracijo v raztopini.

UV-Vis spektroskopija temelji na absorpciji ultravijolične in vidne svetlobe. Absorpcija je proces, pri katerem kemijske substance v za svetlobo prepustnem mediju selektivno sprejmejo točno določene frekvence elektromagnetnega sevanja.

Absorbanca A je definirana kot:

$$A = \log_{10} T = \log I_0/I \quad \dots(1)$$

I_0 = začetna intenziteta sevanja,
 I = izhodna intenziteta sevanja,
 T = transmisija,
 A = absorbanca.

3.10.1 Beer – Lambertov zakon

Povzeto po Lobnik (2010). Absorbanca je odvisna od količine molekul, ki absorbirajo elektromagnetno valovanje, ko le-to preide skozi raztopino. Z drugimi besedami, absorbanca je odvisna tako od koncentracije raztopine kot tudi od dolžine poti svetlobe pri prehodu skozi raztopino; neodvisna pa je od intenzitete elektromagnetnega sevanja. Razmerje med absorbanco, koncentracijo in dolžino poti sevanja je definirano kot Beer - Lambertov zakon:

$$A = C \times I \times \varepsilon \quad \dots(2)$$

Kjer je:

C = koncentracija raztopine [mol/l],
 I = dolžina poti valovanja skozi raztopino [cm],
 ε = molarna absorptivnost,
 A = absorbanca.

3.10.2 Določitev deleža proantocianidinov

Vsebnost proantocianidinov v lesu bukve smo določali z UV-Vis spektrofotometrijo. Kot reagent smo uporabili 70 % H_2SO_4 (žveplova(VI) kislina). Reagent smo pripravili tako, da smo 96% žveplovo kislino redčili z destilirano vodo. Razmerje med žvepleno kislino in destilirano vodo je bilo 100 ml 96 % žveplove kisline in 68,16 ml destilirane vode.

Za pripravo barvnega reagenta smo uporabili vanilin (slika 18).



Slika 18: Vanilin

Barvni reagent smo pripravili tako, da smo 1,5g vanilina zmešali s 150ml 70 % H_2SO_4 .



Slika 19: Barvni reagent

Za slepi vzorec smo uporabili 100 ml 60 % MeOH .

Za pripravo osnovne raztopine smo uporabili (+) – katehin. Priprava osnovne raztopine za umeritvene krivulje:

1. 250 mg/l – samo raztopina katehina
2. 125 mg/l – 5 ml 250 mg/l + 5 ml destilirane vode
3. 62,5 mg/l – 5 ml 125 mg/l + 5 ml destilirane vode
4. 31,25 mg/l – 5 ml 62,5 mg/l + 5 ml destilirane vode
5. 15,62 mg/l – 5 ml 31,25 mg/l + 5 ml destilirane vode
6. 7,812 mg/l – 5 ml 15,62 mg/l + 5 ml destilirane vode
7. 3,906 mg/l – 5 ml 7,812 mg/l + 5 ml destilirane vode



Slika 20: Osnovna raztopina katehina in slepi vzorec

Nato smo vzorce vzeli iz zamrzovalnika ter jih pripravili za pipetiranje (slika 21).



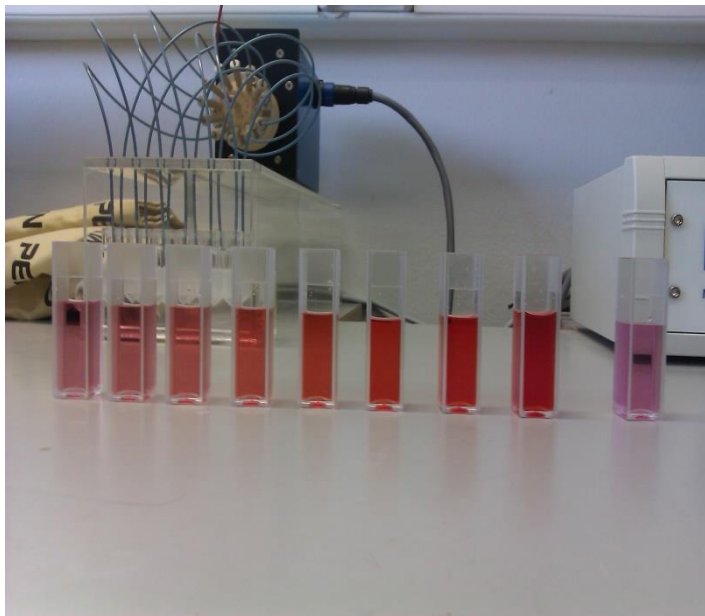
Slika 21: Vzorci, ki so pripravljeni za pipetiranje

Potem smo pričeli s pipetiranjem. Vzeli smo 1 ml vzorca (tudi osnovne raztopine in slepega vzorca) in dodali 2 ml barvnega reagenta. Ko smo vzorcem dodali barvni reagent, smo jih 15 minut pustili pri 20 °C (inkubacijska doba). Po 15 minutah smo reakcijo ustavili. To smo storili tako, da smo vzorce postavili v ledeno kopel (slika 22).



Slika 22: Ledena kopel z vzorci

Na koncu smo morali določiti le še absorbance vzorcev. Absorbanco smo določali z UV-Vis spektrofotometrom Perkin-Elmer Lambda 2 (slika 24) pri valovni dolžini 500 nm. Pri tem smo uporabljali polistirenske kivete. Spektrofotometer je potrebno na začetku umeriti. Za umeritev smo uporabili slepi vzorec (60 % MeOH). Nato smo vsak vzorec prenesli v kiveto, ter izmerili vsebnost proantocianidinov na osnovi absorbance A_{500} .



Slika 23: Barvna lestvica vzorcev (po inkubacijski dobi)



Slika 24: UV-Vis spektrofotometer

3.11 IZRAČUNI

- 1.) Za določitev deleža suhe snovi, smo uporabili gravimetrično metodo, ki je opisana na strani 9. Nato pa smo izračunali delež suhe snovi po sledeči enačbi:

$$\text{Delež suhe snovi} = \frac{\text{masa absolutno suhega lesa [g]}}{\text{masa vlažnega lesa [g]}} \quad \dots(3)$$

- 2.) Ko smo izračunali delež suhe snovi, smo lahko izračunali tudi maso absolutno suhega lesa celotnega vzorca (dw). Maso absolutno suhega vzorca smo potrebovali pri nadaljnjih izračunih. Računali smo po enačbi:

$$dw = \text{masa vzorca} \times \text{delež suhe snovi} \quad \dots(4)$$

- 3.) Nato smo izračunali delež celokupnih ekstraktibilnih snovi. Delež smo izračunali tako, da smo razliko mas tulcev (razlika mas pred ekstrakcijo in po njej) delili z maso absolutno suhega vzorca:

$$\text{Delež celokupnih ekstraktivov} = \frac{\Delta m}{dw} \quad \dots(5)$$

$$\Delta m = \text{masa tulca pred ekstrakcijo [g]} - \text{masa tulca po ekstrakciji [g]} \quad \dots(6)$$

- 4.) Delež hidrofilnih ekstraktivov smo izračunali iz mas epruvetk:

$$\text{Delež hidrofilnih ekstraktivov} = \frac{\text{masa suhega ekstrakta (ostanka)[g]} \cdot 0,250[\text{l}]}{\text{masa absolutno suhega vzorca[g]} \cdot 0,01[\text{l}]} \cdot 1000 \left[\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right] \quad \dots(7)$$

$$\text{Masa suhega ostanka} = \text{masa epruvete (po sušenju)} - \text{masa epruvete} \quad \dots(8)$$

- 5.) Nato smo izračunali še delež lipofilnih ekstraktivov:

$$\text{Delež lipofilnih ekstraktivov} = \frac{\text{masa suhega ekstrakta (ostanka)[g]} \cdot 0,250[\text{l}]}{\text{masa absolutno suhega vzorca[g]} \cdot 0,01[\text{l}]} \cdot 1000 \left[\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right] \quad \dots(9)$$

- 6.) Na koncu pa smo izračunali še delež proantocianidinov. Za izračun deleža proantocianidinov smo potrebovali masno koncentracijo proantocianidinov (y) v metanolnih ekstraktih. To smo dobili s pomočjo enačbe premice regresijskega modela.

$$y \left[\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right] = \frac{\text{absorbanca} - 0,30853}{0,04026} \quad \dots(10)$$

Delež proantocianidinov smo izračunali iz enačbe:

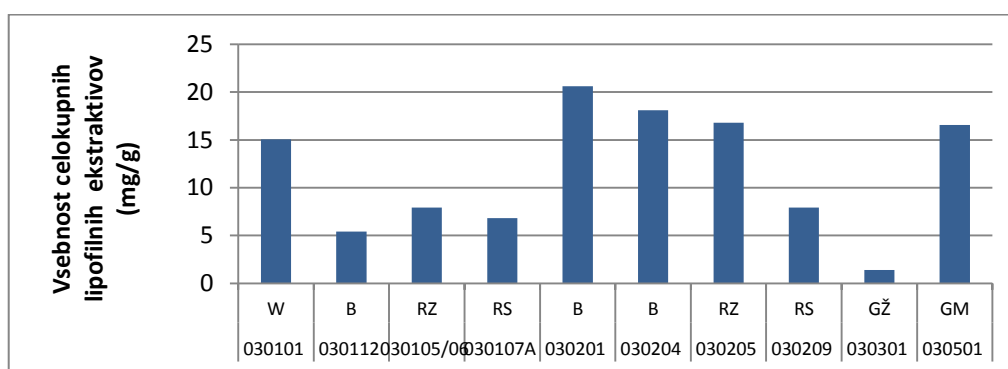
$$\text{Delež proantocianidinov [mg/g]} = \frac{y\left[\frac{\text{mg}}{\text{l}}\right] * 0,250\text{l}}{dw} \quad \dots(11)$$

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Ker smo z zgoraj opisanimi metodami za vsako drevo dobili detajlen vpogled v porazdelitev različnih skupin ekstraktivov po tkivih, smo to poglavje organizirali v štiri podpoglavja. V vsakem podpoglavju obravnavamo porazdelitev posamezne skupine ekstraktivov po drevesih, podpoglavje pa zaključuje sinteza rezultatov in prikaz povprečnih vrednosti. V nadaljevanju sledi analiza teh rezultatov in njihove medsebojne zveze.

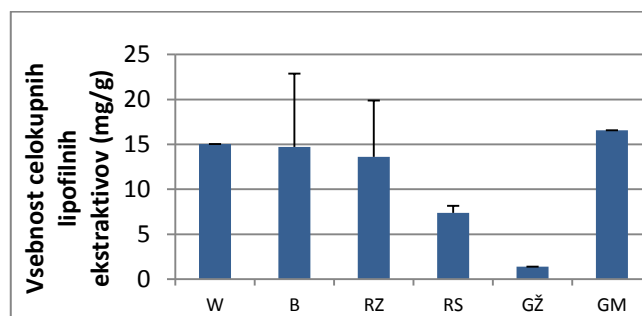
4.1 VSEBNOST LIPOFILNIH EKSTRAKTIVOV

Vzorec z največjo vsebnostjo lipofilnih ekstraktivov v drevesu 3 (slika 25), najdemo v beljavi (B) in znaša 20,6. Najmanjša vsebnost pa je v živi grči (GŽ).



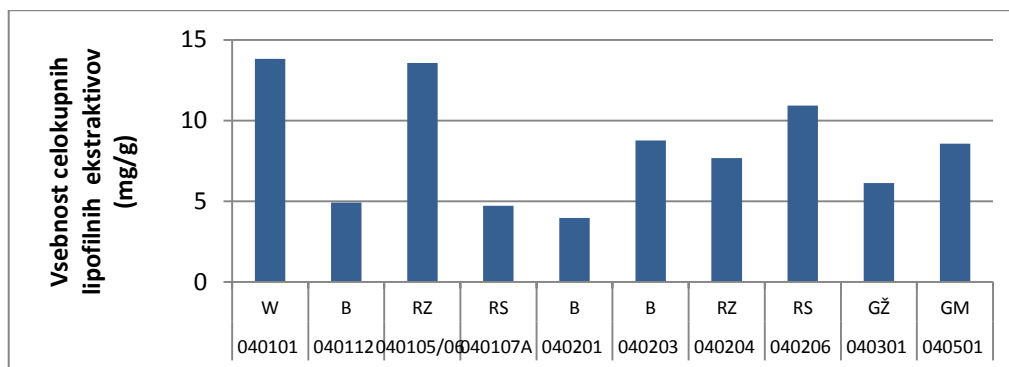
Slika 25: Vsebnost lipofilnih ekstraktivov v drevesu številka 3

Največjo povprečno vsebnost (slika 26) ima mrtva grča (16,57), najmanjšo vsebnost pa najdemo v živi grči (1,40).



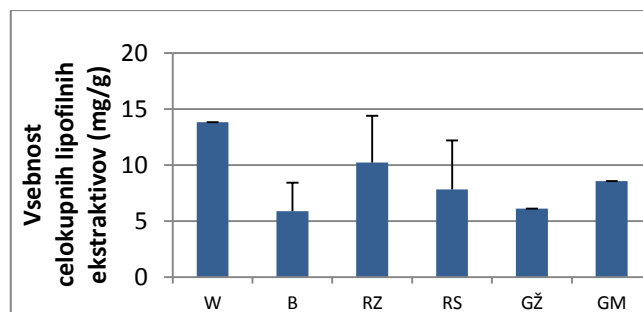
Slika 26: Povprečna vsebnost lipofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 3

V drevesu 4 (slika 27) pa je največja vsebnost v poranitvenem delu (W), malo ekstraktivov pa vsebuje vzorec beljave (B).



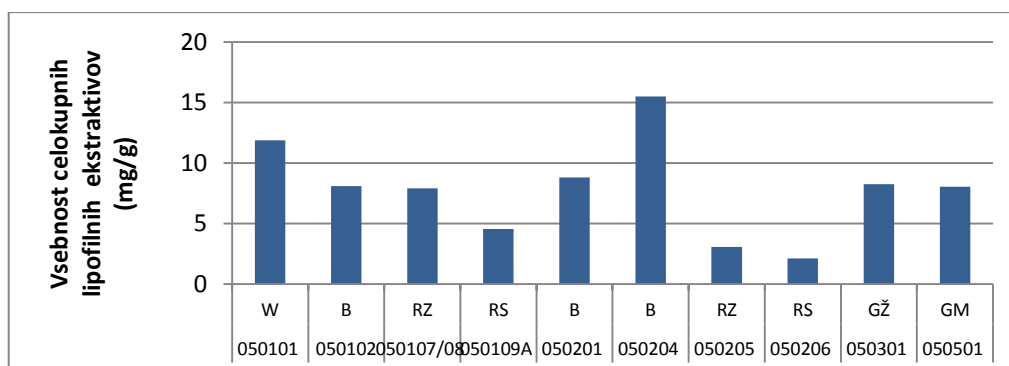
Slika 27: Vsebnost lipofilnih ekstraktivov v drevesu številka 4

V drevesu 4 (slika 28) največ celokupnih lipofilnih ekstraktivov vsebuje vzorec poranitvenega lesa (13,82), vzorci beljave pa v povprečju vsebujejo najmanjšo vrednost (5,88).



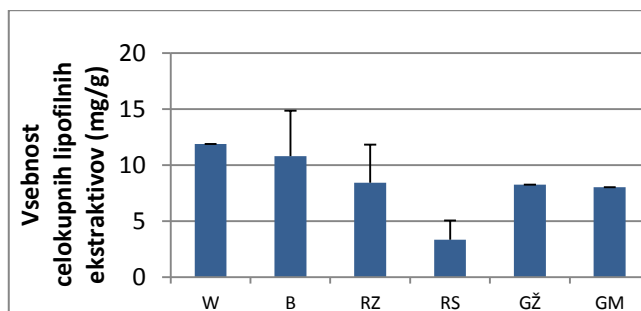
Slika 28: Povprečna vsebnost lipofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 4

V drevesu 5 (slika 29) pa ponovno najdemo največjo vsebnost v vzorcu beljave (B), najmanjšo vsebnost pa v rdečem srcu (RS).



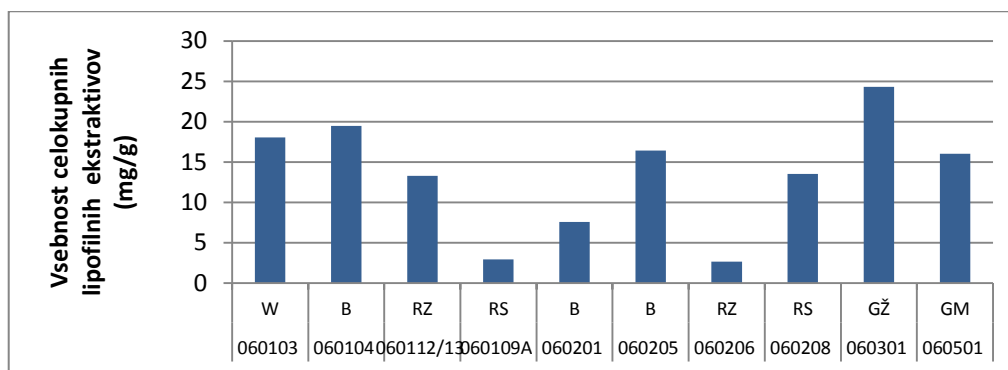
Slika 29: Vsebnost lipofilnih ekstraktivov v drevesu številka 5

Tudi v drevesu 5 (slika 30) je v povprečju največja vsebnost v poranitvenem delu (11,88). Najmanjšo vsebnost pa najdemo v vzorcih z rdečim srcem (3,34).



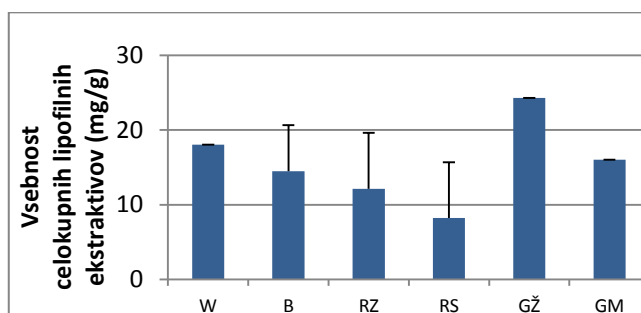
Slika 30: Povprečna vsebnost lipofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 5

Pri drevesu 6 (slika 31) ima najmanjšo vsebnost vzorec iz reakcijske cone (RZ), največjo vsebnost pa vzorec žive grče (GŽ).



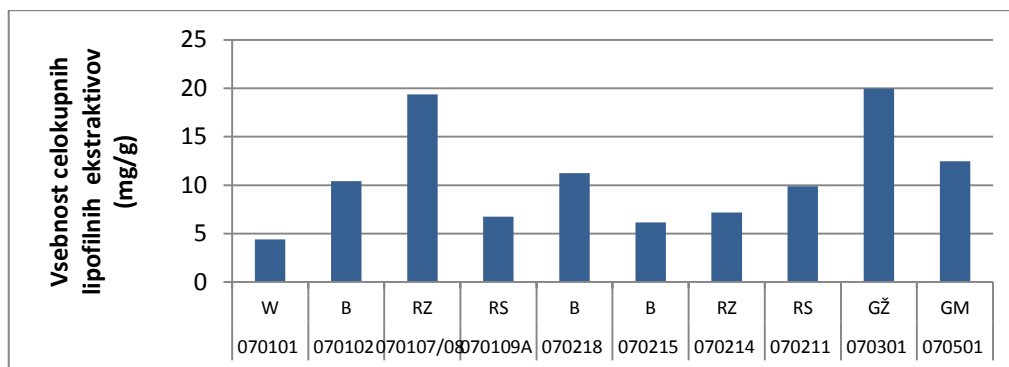
Slika 31: Vsebnost lipofilnih ekstraktivov v drevesu številka 6

Največja vsebnost (slika 32) je prisotna v živi grči (24,29), najmanjšo vsebnost pa imajo v povprečju vzorci rdečega srca (8,24).



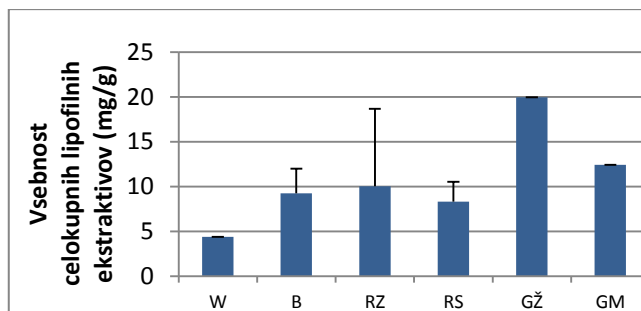
Slika 32: Povprečna vsebnost lipofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 6

Ponovno ima največjo vsebnost (slika 33) vzorec žive grče (GŽ). Najmanjšo vsebnost pa ima tokrat vzorec poranitvenega dela (W).



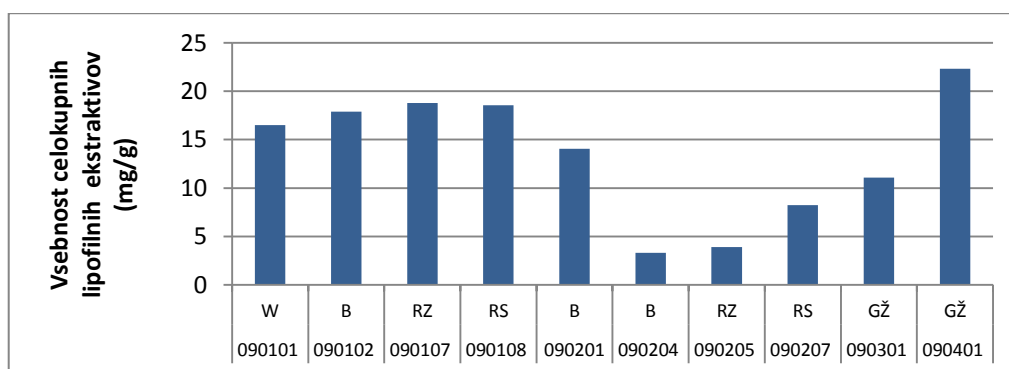
Slika 33: Vsebnost lipofilnih ekstraktivov v drevesu številka 7

Največjo vsebnost (slika 34) ima vzorec žive grče (19,98), najmanjšo vsebnost pa vzorec poranitvenega dela (4,41).



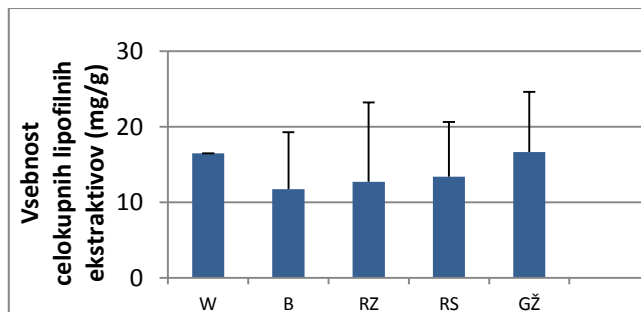
Slika 34: Povprečna vsebnost lipofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 7

Vzorec žive grče (GŽ) vsebuje največjo vrednost pri drevesu 9 (slika 35). Vzorec beljave (B) pa vsebuje najmanjši delež celokupnih lipofilnih ekstraktivov.

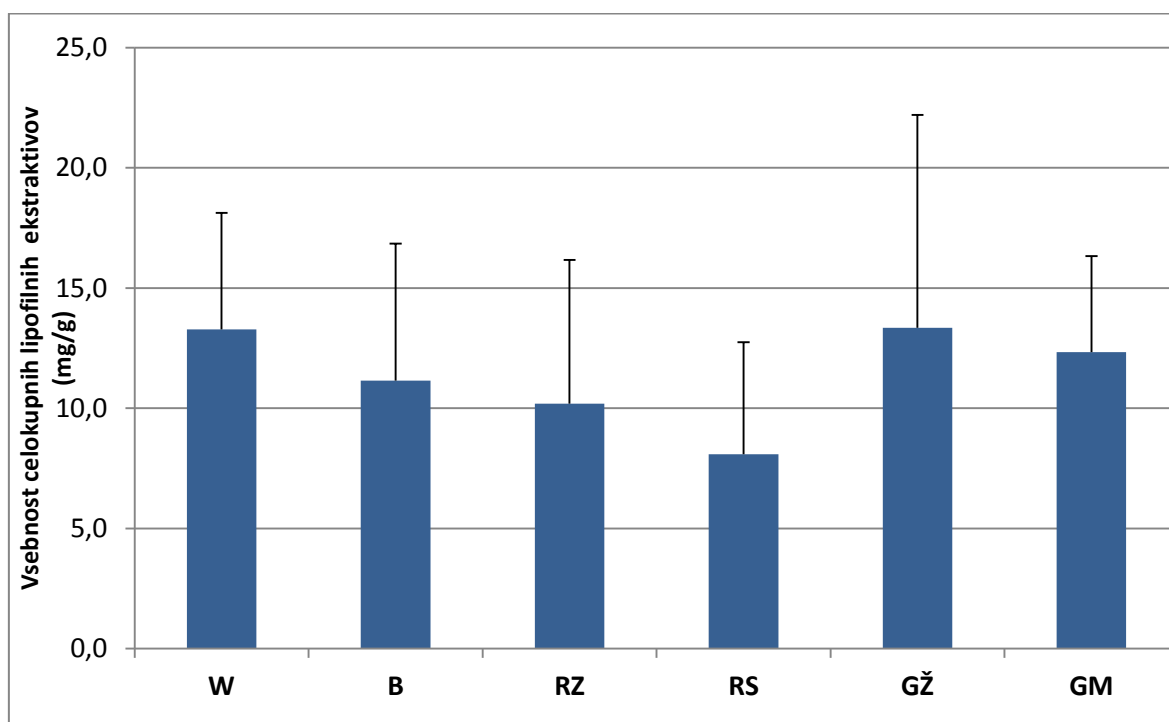


Slika 35: Vsebnost lipofilnih ekstraktivov v drevesu številka 9

Povprečna vsebnost celokupnih lipofilnih ekstraktivov v drevesu 9 (slika 36) je zelo enakomerna. V povprečju imata največjo vsebnost vzorca žive grče (16,69). Najmanjšo vsebnost pa imajo v povprečju vzorci beljave (11,75).



Slika 36: Povprečna vsebnost lipofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 9

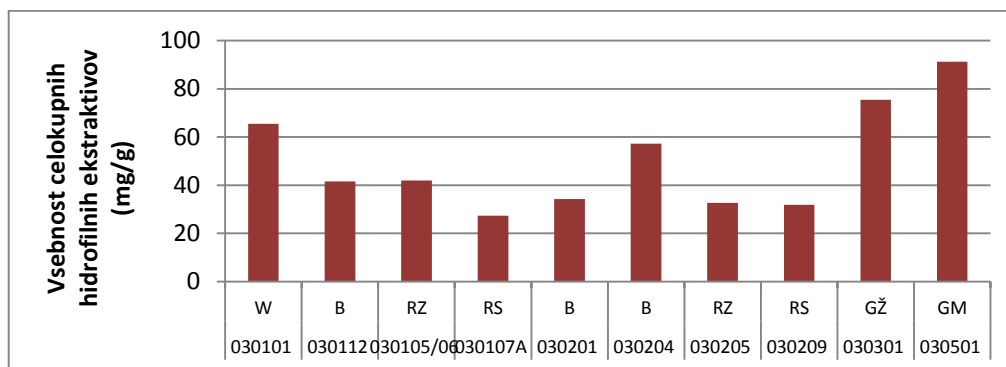


Slika 37: Povprečna vsebnost lipofilnih ekstraktivov v vseh drevesih

Največja vsebnost v povprečju (slika 37) je v vzorcih žive grče (13,35). Malo manjšo vsebnost imajo vzorci poranitvenega dela (13,28). Vzorci z mrtvo grčo imajo 12,33. Nato pa si sledijo vzorci beljave (11,15), reakcijske cone (10,18), najmanjšo vsebnost pa imajo vzorci rdečega srca (8,08).

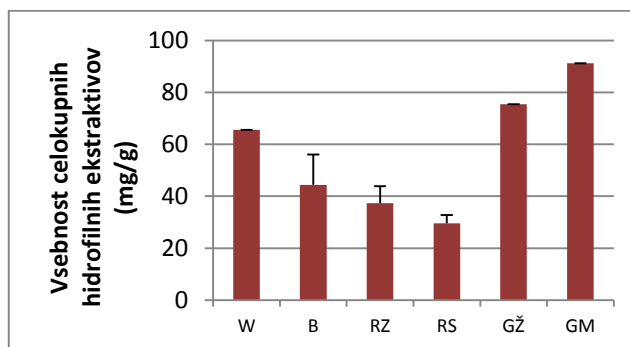
4.2 VSEBNOST CELOKUPNIH HIDROFILNIH EKSTRAKTIVOV

Največjo vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov v drevesu 3 (slika 38) ima vzorec mrtve grče (GM). Najmanjšo vsebnost pa vzorec rdečega srca (RS).



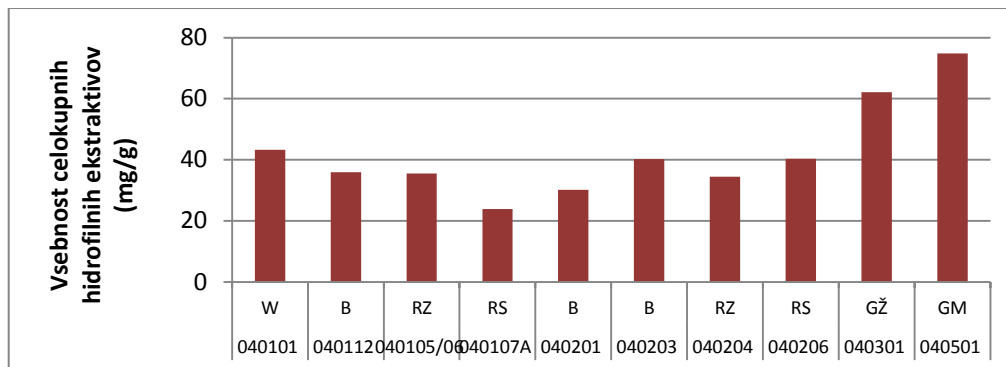
Slika 38: Vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov v drevesu številka 3

Vzorec mrtve grče (slika 39) ima največjo vsebnost (91,25), najmanjšo vsebnost pa ima v povprečju rdeče srce (29,56).



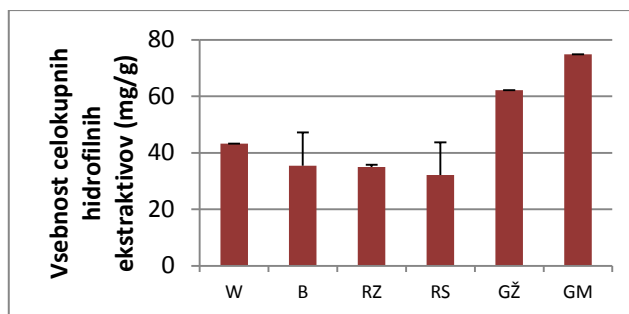
Slika 39: Povprečna vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 3

Tudi v drevesu 4 (slika 40) ima največjo vsebnost vzorec mrtve grče (GM). Najmanjšo vsebnost pa vzorec rdečega srca (RS). Podatki na grafu za drevo 4 so zelo podobni tistim na grafu drevesa 3.



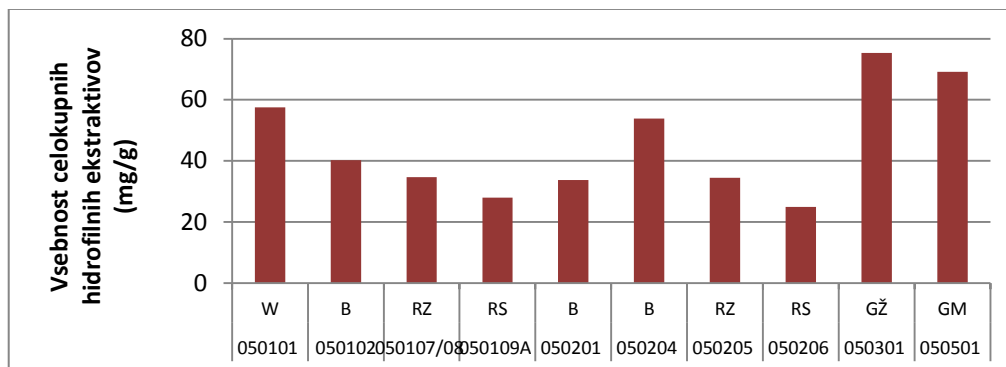
Slika 40: Vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov v drevesu številka 4

Največjo vsebnost (slika 41) ima vzorec mrtve grče (74,84), najmanjšo vsebnost pa izkazujeta vzorca rdečega srca (32,08).



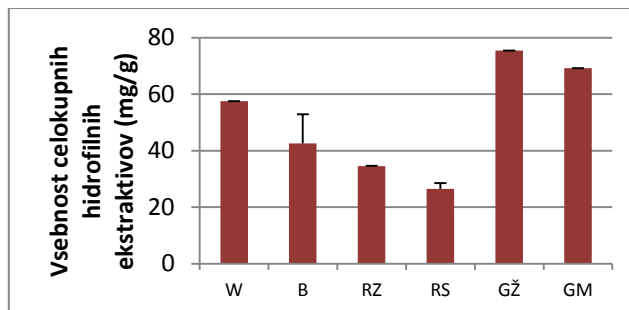
Slika 41: Povprečna vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 4

V drevesu 5 (slika 42) ima največjo vsebnost vzorec žive grče (GŽ), najmanjšo vsebnost pa vzorec rdečega srca (RS).



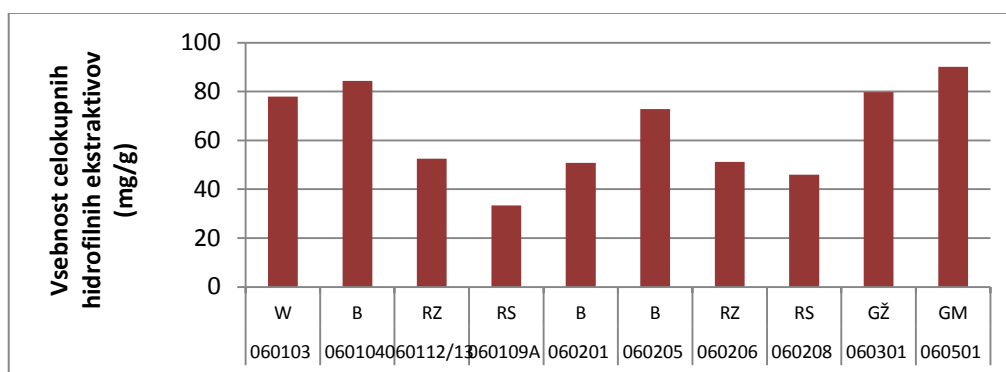
Slika 42: Vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov v drevesu številka 5

Drevo 5 (slika 43) pa se nekoliko razlikuje od prejšnjih dveh. Največjo vsebnost beležimo pri vzorcu žive grče (75,37), najmanjšo vsebnost pa imata v povprečju vzorca rdečega srca (26,41).



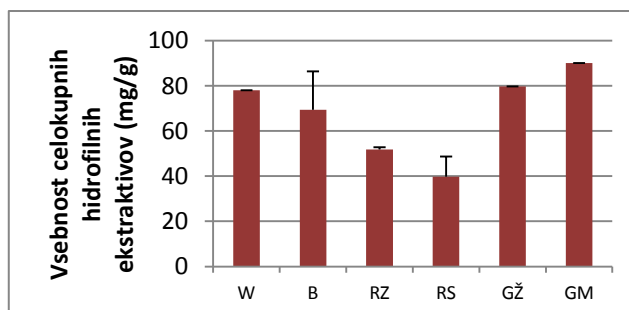
Slika 43: Povprečna vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 5

Pri drevesu 6 (slika 44) ima največjo vsebnost ponovno vzorec mrtve grče (GM), najmanjšo vsebnost pa vzorec rdečega srca (RS).



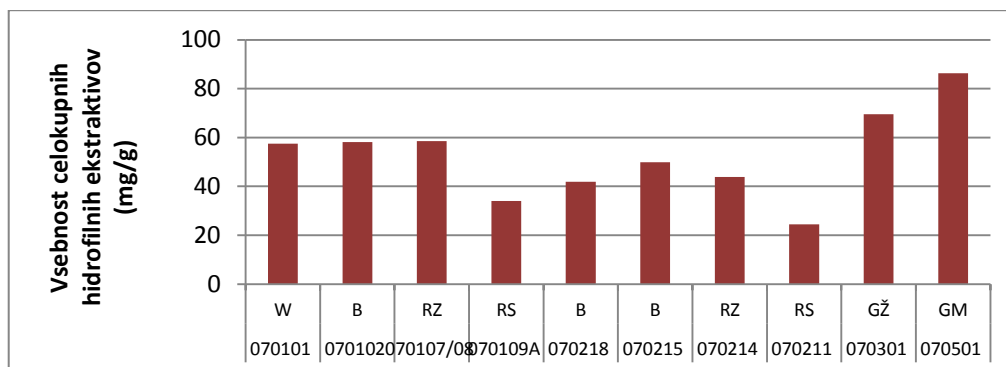
Slika 44: Vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov v drevesu številka 6

Največjo vsebnost (slika 45) ima vzorec mrtve grče (90,07), najmanjšo pa vzorca z rdečim srcem (39,68).



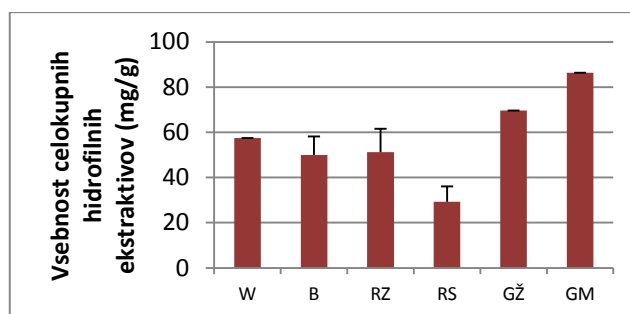
Slika 45: Povprečna vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 6

Vzorec mrtve grče (GM) ima tudi pri drevesu 7 (slika 46) največjo vsebnost hidrofilnih ekstraktivov. Prav tako pa ima najmanjšo vsebnost vzorec rdečega srca (RS).



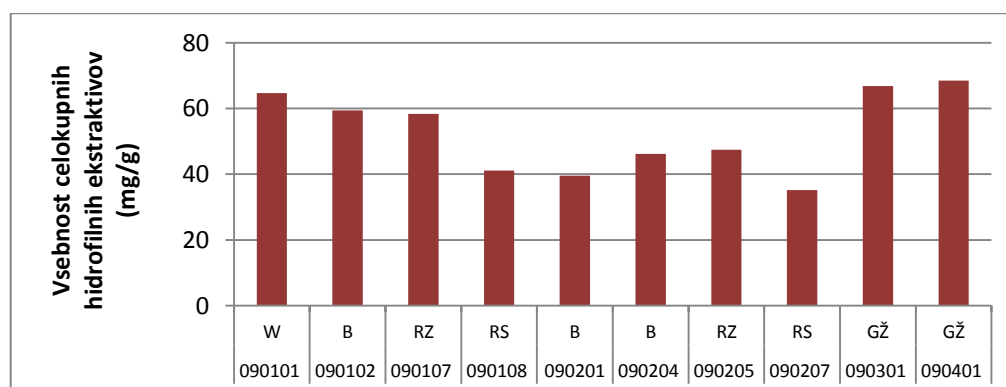
Slika 46: Vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov v drevesu številka 7

Največjo vsebnost (slika 47) ima vzorec mrtve grče (86,36), najmanjšo pa imata vzorca rdečega srca (29,22).



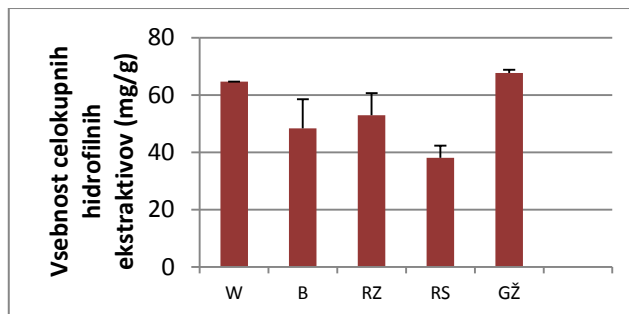
Slika 47: Povprečna vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 7

Pri drevesu 9 (kjer ni vzorcev mrtve grče) pa ima največjo vsebnost (slika 48) vzorec žive grče (GŽ), najmanjšo pa vzorec rdečega srca (RS).

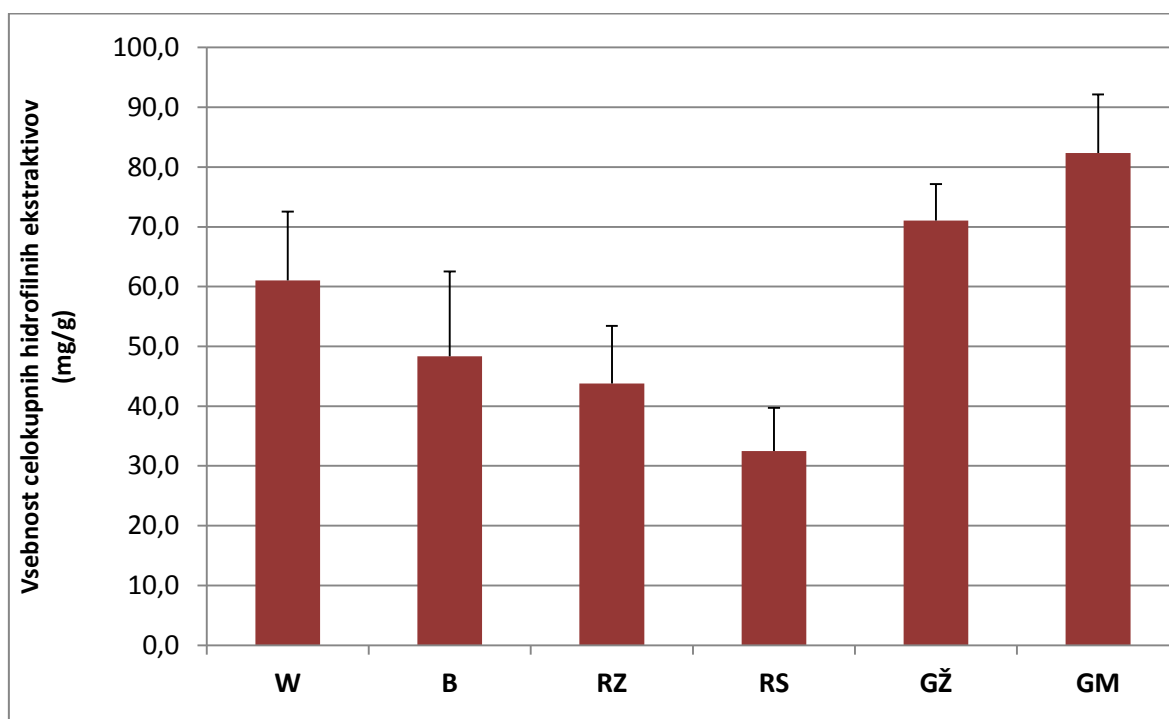


Slika 48: Vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov v drevesu številka 9

Največjo vsebnost (slika 49) celokupnih hidrofilnih ekstraktivov imata v povprečju vzorca žive grče (67,63), najmanjšo vsebnost pa tako kot pri ostalih drevesih vzorca rdečega srca (38,11).



Slika 49: Povprečna vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 9

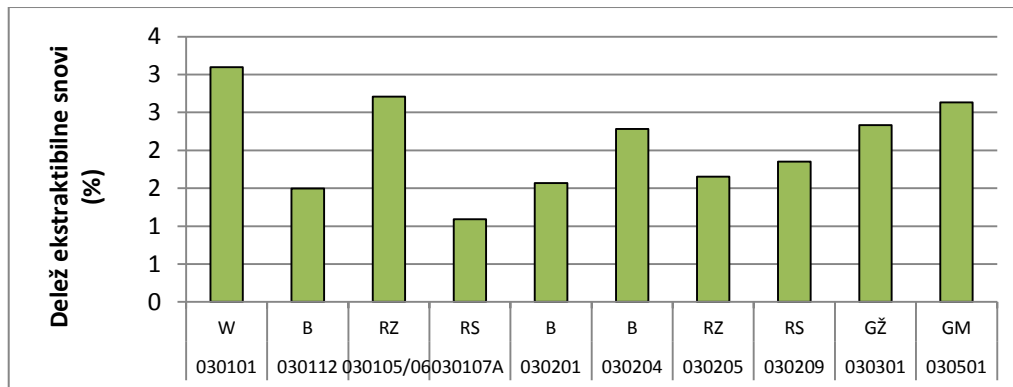


Slika 50: Povprečna vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov v vseh drevesih

V povprečju (slika 50) imajo vzorci mrtvih grč največjo vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov (82,33). Sledijo jim vzorci živih grč (71,07). Vzorci poranitvenega dela imajo vsebnost 61,04. Nato pa si sledijo vzorci beljave (48,43), reakcijske cone (43,78) in rdečega srca (32,51).

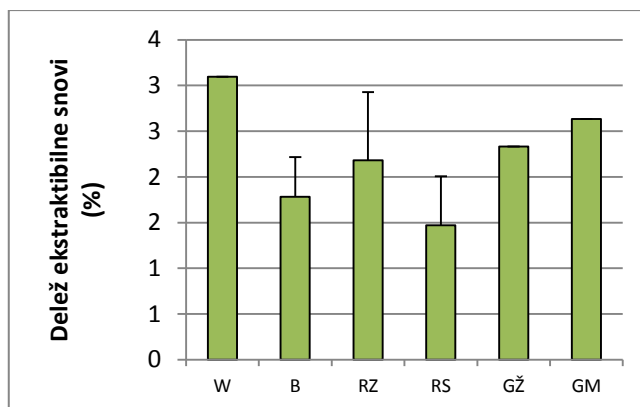
4.3 DELEŽ CELOKUPNIH EKSTRAKTIVOV V POSAMEZNIH DREVESIH

V drevesu številka 3 (slika 51) je največji delež ekstraktivov prisoten v poranitvenem delu (W). Najmanjši delež pa je v delu, kjer je prisotno rdeče srce (RS).



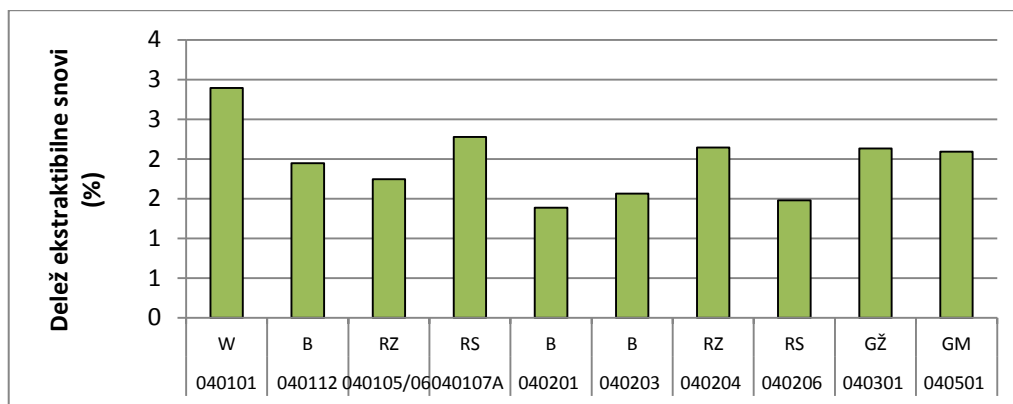
Slika 51: Delež ekstraktivov v drevesu številka 3

Največji delež (slika 52) je prisoten v poranitvenem delu (3,10 %). V ostalih delih pa delež ne variira veliko. Najmanjši delež je v delu, kjer je prisotno rdeče srce (1,47 %).



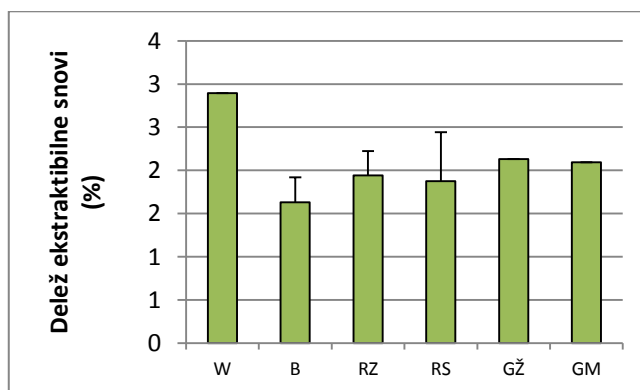
Slika 52: Povprečni delež ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 3

V drevesu številka 4 (slika 53) je največji delež ekstrahibilnih snovi prisoten v poranitvenem delu drevesa (W), najmanjši delež pa je prisoten v beljavi (B).



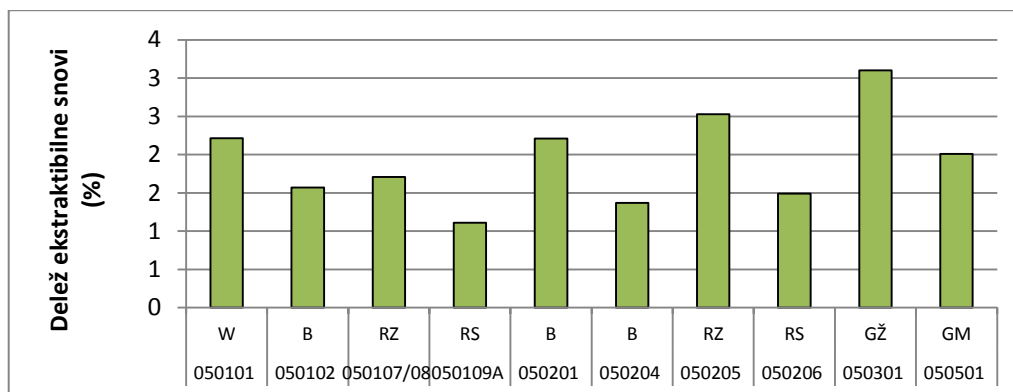
Slika 53: Delež ekstraktivov v drevesu številka 4

Največji delež (slika 54) je prisoten v poranitvenem delu (2,89 %). Najmanjši delež pa je prisoten v beljavi (1,63 %).



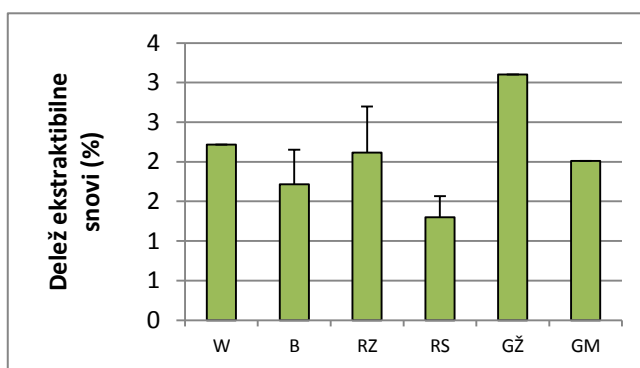
Slika 54: Povprečni delež ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 4

V drevesu številka 5 (slika 55) je največji delež ekstraktivov prisoten v živi grči (GŽ), najmanjši delež pa v delu z rdečim srcem (RS).



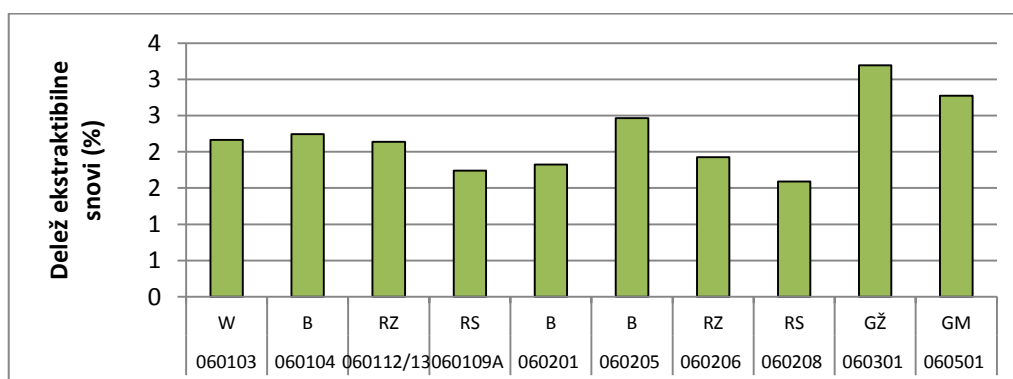
Slika 55: Delež ekstraktivov v drevesu številka 5

Največji delež (3,1 %) je prisoten v živi grči (slika 56), najmanjši (1,3 %) pa v delu z rdečim srcem.



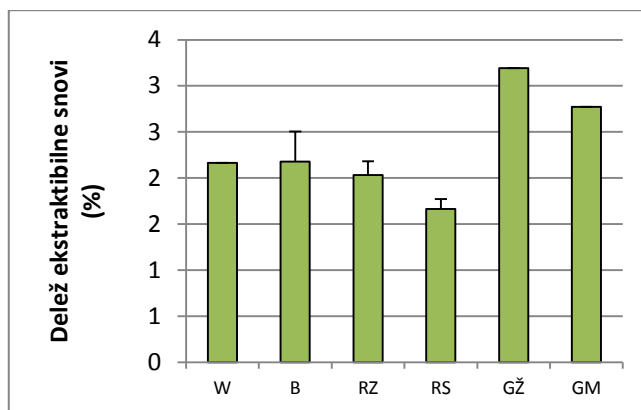
Slika 56: Povprečni delež ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 5

Tudi v drevesu številka 6 (slika 57) je največji delež ekstraktivov prisoten v živi grči (GŽ), prav tako pa je najmanjši delež prisoten v delu z rdečim srcem (RS).



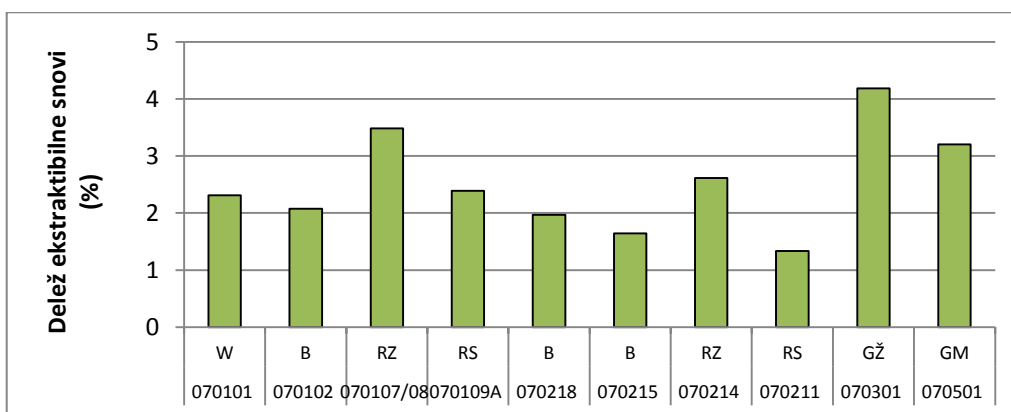
Slika 57: Delež ekstraktivov v drevesu številka 6

Največji delež (slika 58) je prisoten v živi grči (3,19 %), najmanjši pa v rdečem srcu (1,66 %).



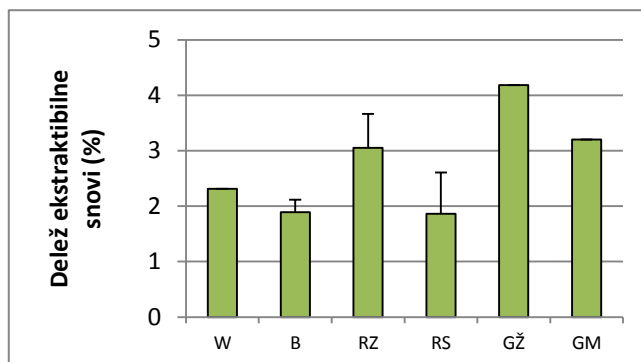
Slika 58: Povprečni delež ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 6

V drevesu številka 7 (slika 59) je največji delež prisoten v živi grči (GŽ), najmanjši delež pa ponovno v delu z rdečim srcem (RS).



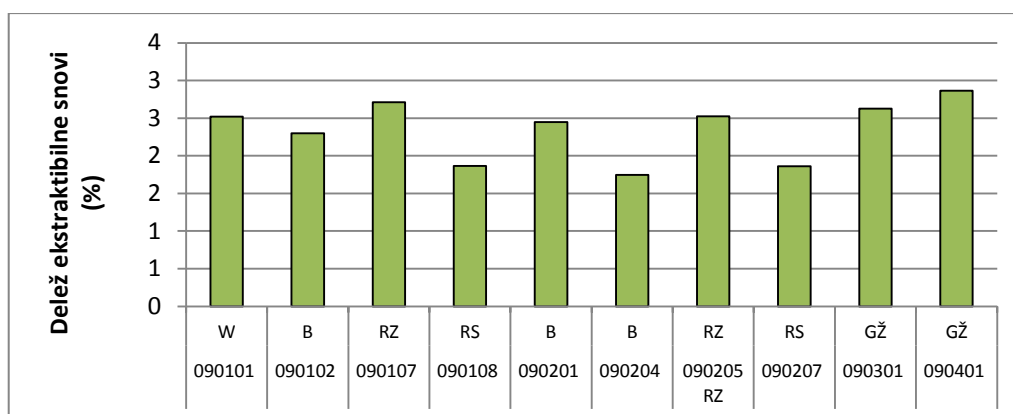
Slika 59: Delež ekstraktivov v drevesu številka 7

Največji delež (slika 60) je prisoten v živi grči (4,18), najmanjši pa v rdečem srcu (1,86 %).



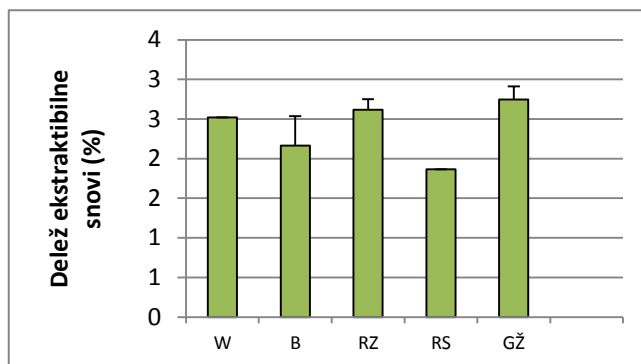
Slika 60: Povprečni delež ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 7

V drevesu številka 9 (slika 61) je delež prisotnih ekstraktivov zelo enakomeren. Pri drevesu 9 nismo imeli vzorca mrtve grče, temveč smo vzeli dva vzorca žive grče. Največji delež je bil prisoten v delu z živo grčo (GŽ), najmanjši delež pa v delu z rdečim srcem (RS).

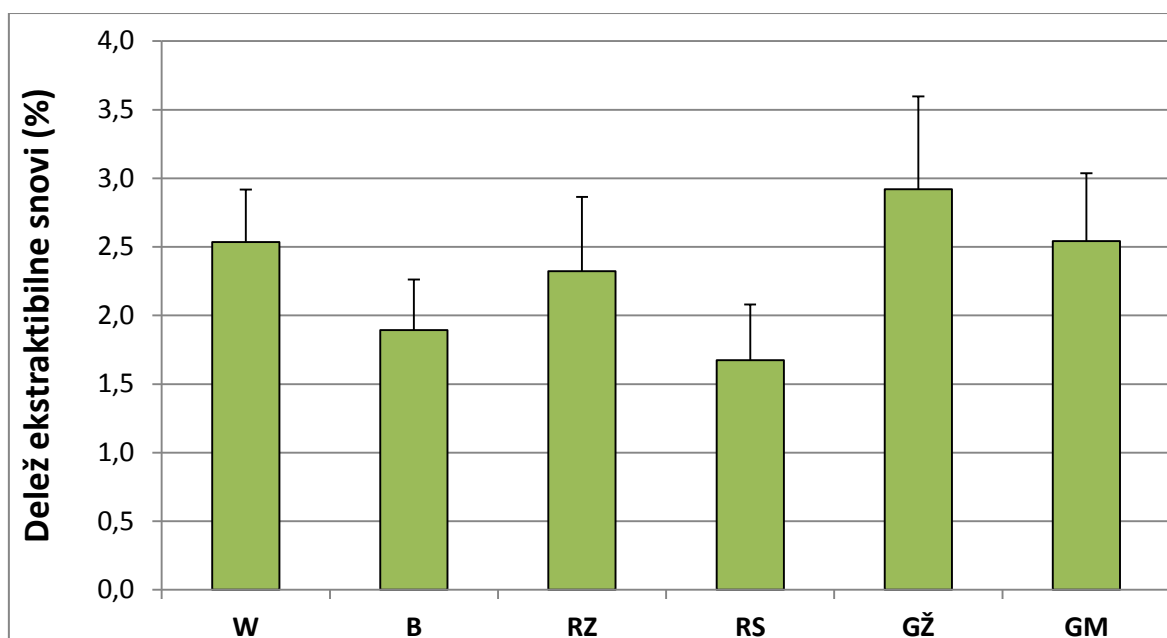


Slika 61: Delež ekstraktivov v drevesu številka 9

V drevesu številka 9 (slika 62) je največji delež (2,75 %) prisoten v živi grči, najmanjši (1,86 %) pa v rdečem srcu.



Slika 62: Povprečni delež ekstraktivov po tkivih v drevesu številka 9

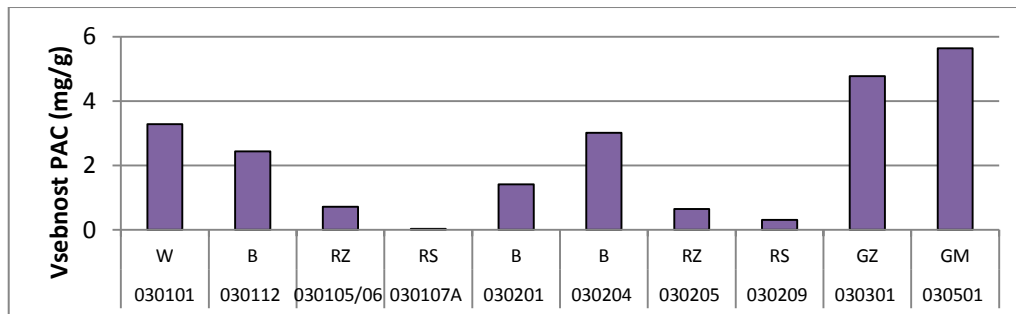


Slika 63: Povprečna vsebnost celokupnih ekstraktibilnih snovi za vsa drvesa

Kot smo lahko razbrali iz prejšnjih grafov, je največji delež ekstraktibilnih snovi v drevesih (slika 63) prisotnih v delu z živo grčo (2,92 %). V mrtvi grči je prisotno 2,54 %, v poranitvenem delu je v povprečju prisotno 2,53 %. V reakcijski coni je prisotno 2,32 %. 1,89 % je prisotno v beljavi, najmanjši delež pa v delu z rdečim srcem (1,67 %).

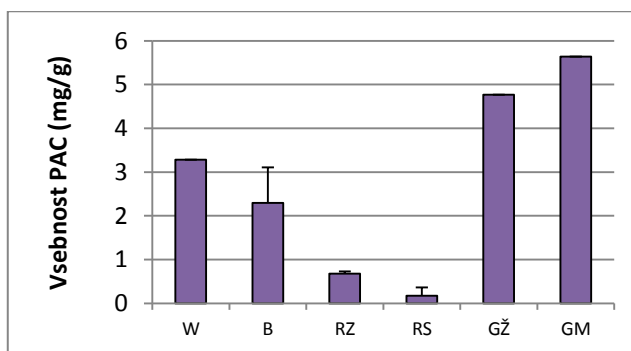
4.4 VSEBNOST PROANTOCIANIDINOV V POSAMEZNIH DREVESIH

Največja vsebnost proantocianidinov v drevesu 3 (slika 64), je v mrtvi grči (GM), najmanjša pa v rdečem srcu (RS).



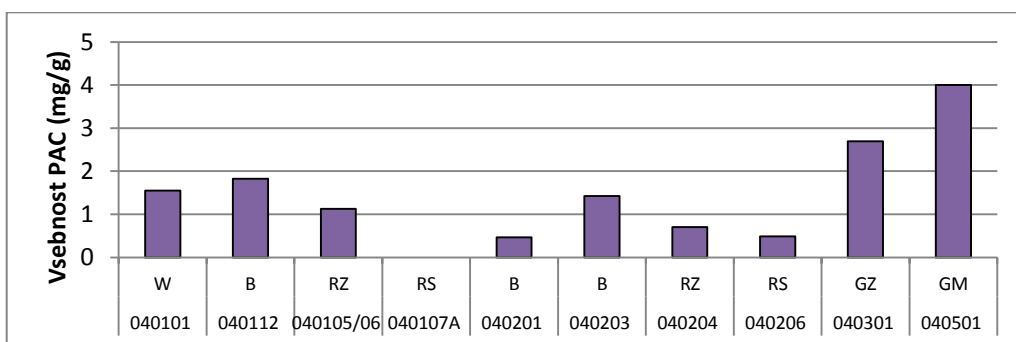
Slika 64: Vsebnost proantocianidinov v drevesu številka 3

Mrtva grča vsebuje (slika 65) največ PAC (5,64), najmanj pa rdeče srce (0,17).



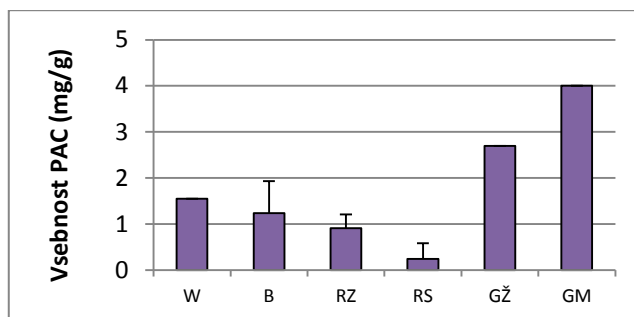
Slika 65: Povprečna vsebnost proantocianidinov po tkivih v drevesu številka 3

Največja vsebnost PAC je tudi pri drevesu številka 4 (slika 66) v mrtvi grči (GM), zelo majhna vsebnost pa je v delu z rdečim srcem (RS).



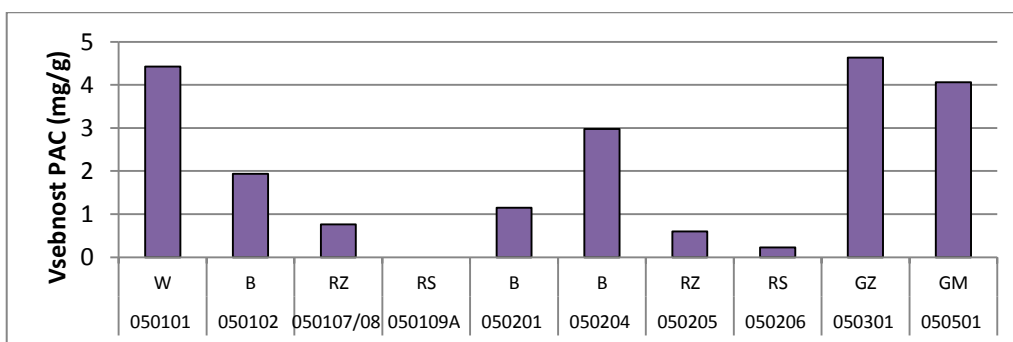
Slika 66: Vsebnost proantocianidinov v drevesu številka 4

Vsebnost pri drevesu 4 je največja (4,00) v mrtvi grči (slika 67), najmanjša vsebnost pa je v rdečem srcu (0,24).



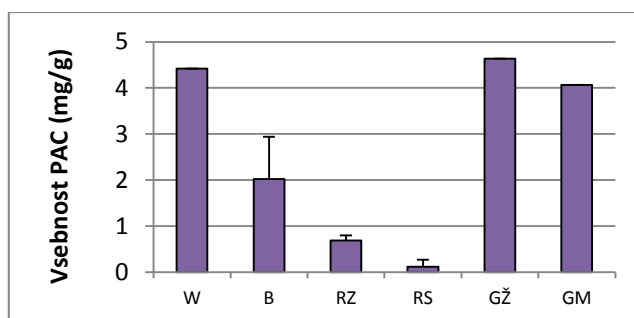
Slika 67: Povprečna vsebnost proantocianidinov po tkivih v drevesu številka 4

Največja vsebnost (slika 68, drevo številka 5) je v mrtvi grči (GM), najmanjša pa v rdečem srcu (RS).



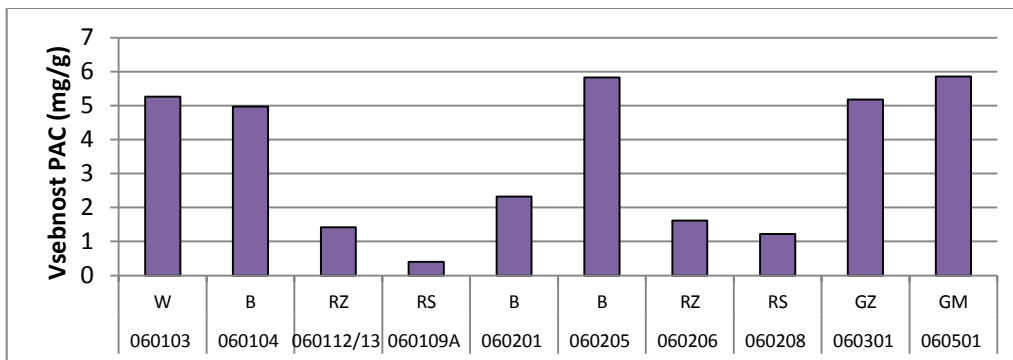
Slika 68: Vsebnost proantocianidinov v drevesu številka 5

Največja vsebnost proantocianidinov (drevo 5, slika 69) je v mrtvi grči (4,63), in zelo velika vsebnost tudi v poranitvenem delu (4,42), najmanjša vsebnost pa je bila ponovno v rdečem srcu (0,11).



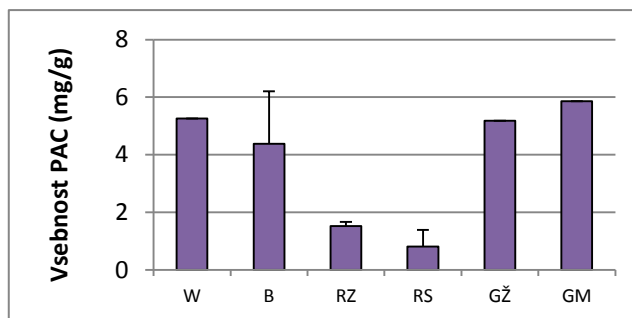
Slika 69: Povprečna vsebnost proantocianidinov po tkivih v drevesu številka 5

V drevesu številka 6 (slika 70) je vsebnost PAC največja v mrtvi grči (GM), prav tako pa je vsebnost PAC podobno velika v enem od vzorcev beljave (B), najmanjša vsebnost pa v rdečem srcu (RS).



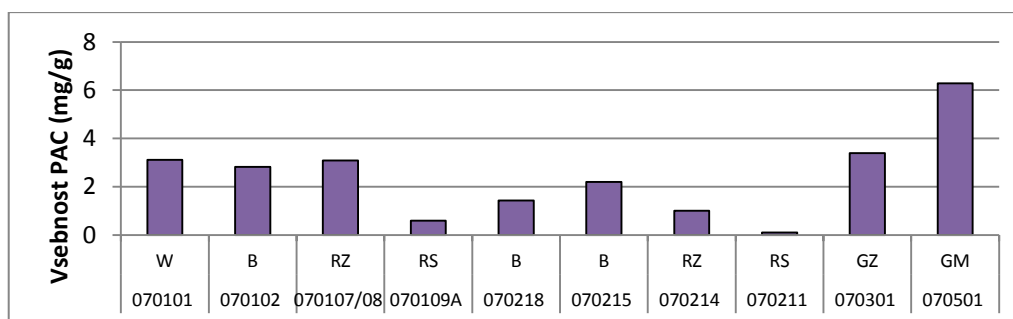
Slika 70: Vsebnost proantocianidinov v drevesu številka 6

V mrtvi grči (drevo št. 6, slika 71) je največja vsebnost PAC (5,86), najmanjša vsebnost pa v rdečem srcu (0,81).



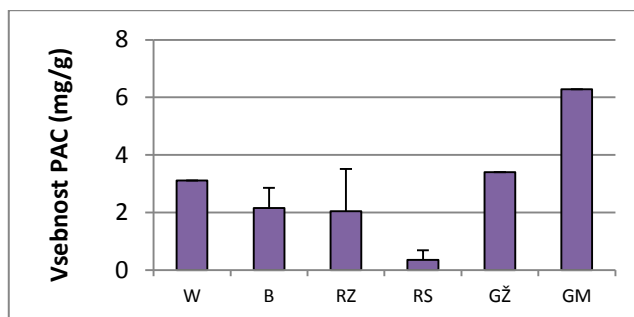
Slika 71: Povprečna vsebnost proantocianidinov po tkivih v drevesu številka 6

Tudi v drevesu številka 7 (slika 72) je bila največja vsebnost v mrtvi grči (GM), najmanjša pa v rdečem srcu (RS).



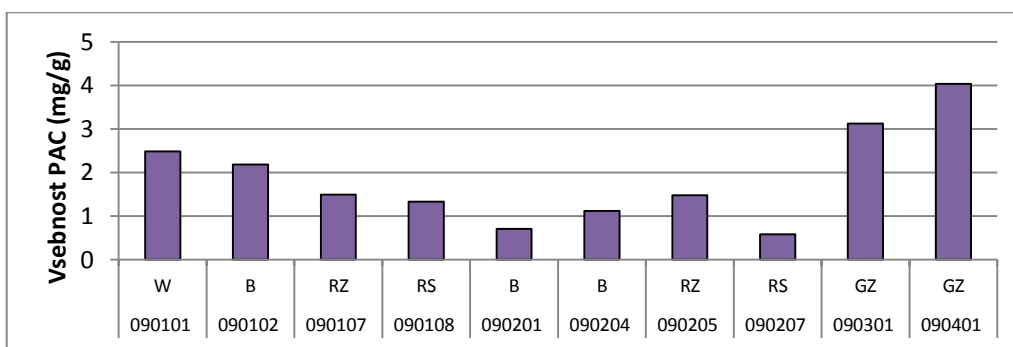
Slika 72: Vsebnost proantocianidinov v drevesu številka 7

Zelo velika vsebnost v drevesu številka 7 (slika 73) je v mrtvi grči (6,28), zelo majhna vsebnost pa kot v ostalih drevesih v rdečem srcu (0,35).



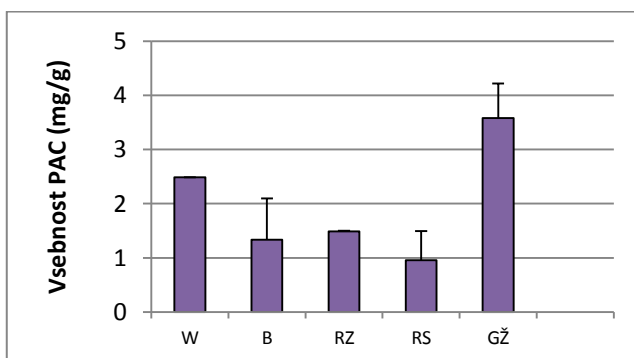
Slika 73: Povprečna vsebnost proantocianidinov po tkivih v drevesu številka 7

V drevesu številka 9 (slika 74) pa vzorcev z mrtvo grčo ni, zato je največja vsebnost v delu z živo grčo (GŽ). Najmanjša vsebnost je v rdečem srcu (RS).

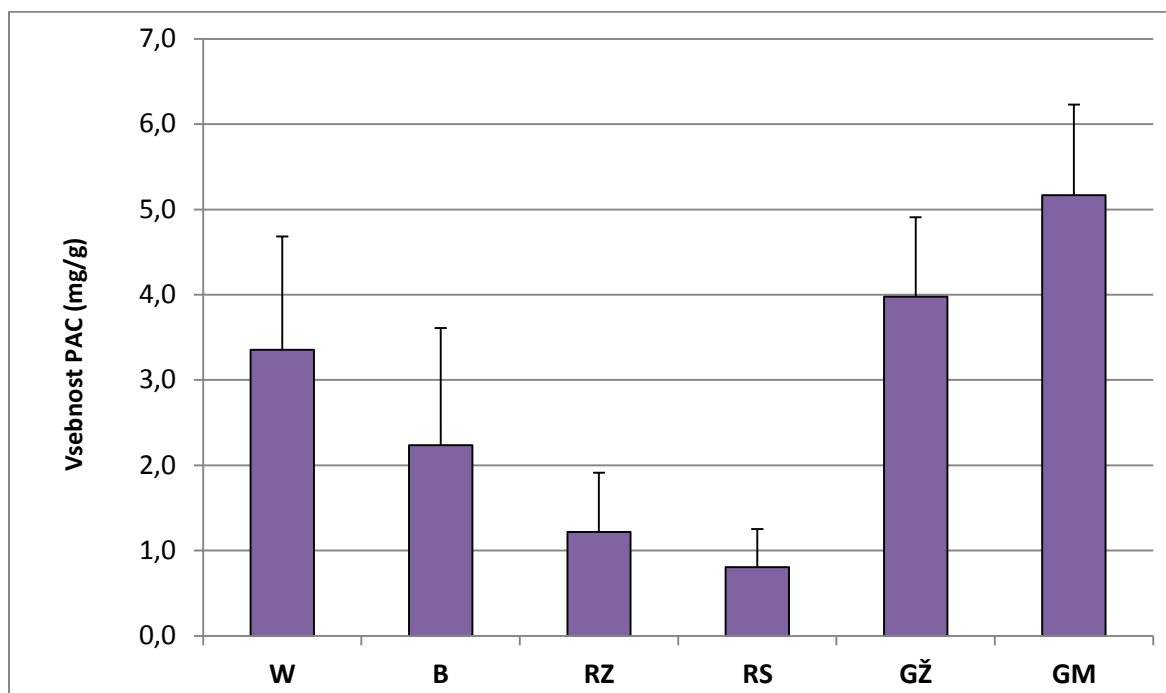


Slika 74: Vsebnost proantocianidinov v drevesu številka 9

Največja vsebnost (slika 75) je v živi grči (3,58), najmanjša pa v rdečem srcu (0,96).



Slika 75: Povprečna vsebnost proantocianidinov po tkivih v drevesu številka 9



Slika 76: Povprečna vsebnost proantocianidinov v vseh drevesih

Največja vsebnost PAC (slika 76) v vseh drevesih je v mrtvi grči (5,17). Živa grča vsebuje nekoliko manj PAC (3,98). Vsebnost v poranitvenem lesu je 3,35. Beljava vsebuje 2,24 mg/g PAC. Malo PAC je v reakcijski coni (1,22), najmanj pa v rdečem srcu (0,81).

5 SKLEPI

Raziskava je pokazala, da imajo največjo vsebnost lipofilnih ekstraktivov vzorci poranitvenega dela, mrtve grče in pa žive grče. Ta tri tkiva izstopajo po deležu lipofilnih ekstraktivov. Najmanjšo vsebnost lipofilnih ekstraktivov najdemo pri vzorcih rdečega srca. Vzorci beljave in reakcijske cone pa imajo podobno vsebnost lipofilnih ekstraktivov. Imajo manjšo vsebnost, kot vzorci poranitvenega dela, mrtve in žive grče, toda večjo kot vzorci rdečega srca.

Največjo vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov najdemo v mrtvi in živi grči (v mrtvi grči največ). Naslednji po vsebnosti so vzorci poranitvenega dela. Tako kot pri merjenju vsebnosti lipofilnih ekstraktivov, je tudi pri merjenju hidrofilnih ekstraktivov najmanjša vsebnost v vzorcih rdečega srca. Dokaj podobne rezultate dobimo pri vzorcih beljave in reakcijske cone, katerih vsebnost je večja kot v vzorcih rdečega srca, a manjša kot vsebnost v vzorcih poranitvenega dela.

Največjo vsebnost celokupnih ekstraktibilnih snovi najdemo v živi grči. Zelo podobne rezultate dobimo pri vzorcih poranitvenega dela, mrtve grče in reakcijske cone. Vsebnost v teh treh delih je nekoliko manjša kot v vzorcih žive grče. Nato sledijo vzorci beljave, ki imajo podobno vsebnost kot vzorci rdečega srca, a še zmeraj večjo. Vzorci rdečega srca imajo ponovno najmanjšo vsebnost.

Največjo vsebnost proantocianidinov imajo vzorci mrtve grče. Sledijo vzorci žive grče. Med debelnimi tkivi ima poranitveni del največjo vsebnost, vendar še vedno manjšo od vzorcev obeh grč. Malo manjšo vsebnost kot poranitveni del ima beljava. Še manjšo vsebnost najdemo pri vzorcih reakcijske cone. Najmanjšo vsebnost pa imajo ponovno vzorci rdečega srca.

6 POVZETEK

Ekstraktivi v lesu niso enakomerno razporejeni. Ponekod najdemo več ekstraktivov, ponekod manj. V diplomski nalogi smo raziskali, v katerem delu bukve je prisotnih največ proantocianidinov.

Cilji diplomske naloge so bili:

- določiti vsebnost proantocianidinov v normalnem in poškodovanem lesu bukve
- določiti vsebnost vseh ekstraktibilnih snovi
- določiti vsebnost lipofilnih snovi
- določiti vsebnost hidrofilnih snovi

Vzorke smo posekali 22. 9. 2011 v Kočevskem Rogu. Izbrali smo drevesa, ki so bila vidno mehansko poškodovana. Iz krošnje smo izžagali dele, ki so imeli žive in mrtve veje. Nato smo izžagali še dva koluta. Enega na bazi drevesa, kjer je bilo drevo mehansko poškodovano. Ta del je vseboval tkiva, ki nastanejo kot posledica mehanske poškodbe. Drugi kolut pa smo izžagali na višini približno 14 m. Ta del pa je vseboval tipično rdeče srce. Kolute smo razžagali v mizarški delavnici na Oddelku za lesarstvo. Iz kolotov smo nato izžagali vse vzorce, ki smo jih potrebovali pri raziskavi. Izžagali smo vzorce beljave, poranitvenega dela, reakcijske cone, rdečega srca, mrtve grče in žive grče. Vzorce smo nato posušili in zmleli z mlinom Retsch SM 2000.

Nato smo določili suho snov. To smo storili z gravimetrično metodo. Natresli smo približno 1 g vzorca ter ga stehali. Nato smo vzorec za en dan postavili v sušilnik ter ga po enem dnevu ponovno stehali (na 4 decimalke natančno). Tehtali smo z analitsko tehtnico Mettler Toledo XS.

Sledila je Soxhletova ekstrakcija. Kot topilo smo izbrali metanol (60 % MeOH). Ekstrahirali smo pri 160 °C, čas postopka je bil 6 ur.

Ugotavljali smo delež celokupnih ekstraktibilnih snovi. To smo storili tako, da smo tulce, ki smo jih uporabili pri ekstrakciji (predhodno smo jih stehali), po ekstrakciji postavili v sušilnik za 24 ur pri 105 °C ter ponovno stehali. S tem smo dobili podatek o deležu celokupnih ekstraktivov.

Nato smo ugotavljali delež celokupnih hidrofilnih ekstraktivov. Epruvetke smo najprej stehali, nato pa v njih pipetirali 10 ml ekstrakta. Epruvetke smo potem vstavili v sušilnik, ter jih pri 80 °C sušili 3 dni. Po treh dneh smo epruvetke ponovno stehali (na 5 decimalk), ter tako dobili delež celokupnih hidrofilnih snovi.

Za ugotavljanje deleža lipofilnih ekstraktivov smo uporabili dietiletersko ekstrakcijo. Najprej smo morali vzorce zakisati. To smo storili s 6M HCl (klorovodikova kislina). Nato je sledila dietiletrska ekstrakcija. Dobljeni ekstrakt smo prelili v predhodno stehane stekleničke. Ekstrakte smo potem sušili ter po sušenju ponovno stehali. Tako smo dobili delež lipofilnih ekstraktivov.

Delež proantocianidinov, pa smo določili z UV-Vis spektrofotometrijo. Kot reagent smo uporabili 70 % H₂SO₄ (žveplova(VI) kislina), katerega smo pripravili v razmerju 100 ml 96% žveplove kisline + 68,16 ml destilirane vode. Za pripravo barvnega reagenta smo uporabili vanilin. Za pripravo osnovne raztopine smo uporabili (+) – katehin. Nato smo vzeli 1 ml vzorca ter mu dodali 2 ml barvnega reagenta. Reakcijo, smo po 15 minutah ustavili, tako da smo vzorce postavili v ledeno kopel. Absorbanco smo določili z UV-Vis spektrofotometrom Perkin-Elmer Lambda 2. Vsak vzorec smo prenesli v kiveto ter izmerili vsebnost proantocianidinov na osnovi absorbance A₅₀₀.

Raziskava je pokazala, da imajo največjo vsebnost lipofilnih ekstraktivov vzorci poranitvenega dela, mrtve grče in žive grče. Ta tri tkiva izstopajo po deležu lipofilnih ekstraktivov. Najmanjšo vsebnost lipofilnih ekstraktivov najdemo pri vzorcih rdečega srca. Vzorci beljave in reakcijske cone imajo podobno vsebnost lipofilnih ekstraktivov. Imajo manjšo vsebnost, kot vzorci poranitvenega dela, mrtve in žive grče, toda večjo kot vzorci rdečega srca.

Največjo vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov najdemo v mrtvi in živi grči (v mrtvi grči največ). Naslednji po vsebnosti so vzorci poranitvenega dela. Tako kot pri merjenju vsebnosti lipofilnih ekstraktivov, je tudi pri merjenju hidrofilnih ekstraktivov najmanjša vsebnost v vzorcih rdečega srca. Dokaj podobne rezultate dobimo pri vzorcih beljave in reakcijske cone, katerih vsebnost je večja kot v vzorcih rdečega srca, a manjša kot vsebnost v vzorcih poranitvenega dela.

Največjo vsebnost celokupnih ekstraktibilnih snovi najdemo v živi grči. Zelo podobne rezultate dobimo pri vzorcih poranitvenega dela, mrtve grče in reakcijske cone. Vsebnost teh treh delov je nekoliko manjša kot v vzorcih žive grče. Nato sledijo vzorci beljave, ki imajo podobno vsebnost kot vzorci rdečega srca, a še zmeraj večjo. Vzorci rdečega srca imajo ponovno najmanjšo vsebnost.

Največjo vsebnost proantocianidinov imajo vzorci mrtve grče. Sledijo vzorci žive grče. Med debelnimi tkivi ima poranitveni del največjo vsebnost, vendar še vedno manjšo od vzorcev obeh grč. Malo manjšo vsebnost kot poranitveni del ima beljava. Še manjšo vsebnost najdemo pri vzorcih reakcijske cone. Najmanjšo vsebnost pa imajo ponovno vzorci rdečega srca.

7 VIRI

- Brus R. 2005. Dendrologija za gozdarje. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire: 408 str.
- Classic Kit: Soxhlet extractor. (2015)
<http://www.rsc.org/chemistryworld/Issues/2007/September/ClassicKitSoxhletExtractor.asp> (4.10.2015)
- Čufar K. 2006. Anatomija lesa-univerzitetni učbenik. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 185 str.
- Lobnik A. 2010. Okoljska analitika – navodila za vaje. Maribor, Univerza v Mariboru, Fakulteta za strojništvo: 2-4
- Oven P. 2001. Mehanske poškodbe drevja. Proteus, 63, 8: 360-370
- Oven P., Rep G., Vek V. 2009. Strukturni gradniki celične stene in variabilnost kemijske sestave lesa. Les, 61, 6: 302-303
- Porter L.J. 1992. Structure and chemical properties of the condensed tannins. V: Plant polyphenols. Synthesis properties, significance, R.W. Hemingway and P.E. Laks, eds (New York and London: Plenum Press): 245-258
- Sjöström E. 1993. Wood Chemistry: Fundamentals and Applications. New York, Academic Press: 293 str.
- Torelli N. 2003. Ojedritev – vloga in proces. Les, 55, 11: 368-378
- Vek V. 2010. Spektrofotometrična določitev deleža celokupnih fenolov, flavonoidov in proantocianidinov. Interno gradivo - laboratorijski protokoli. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo.
- Vek V. 2013. Ekstraktivi v poškodovanem lesu in grčah navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 162 str.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Primožu Ovnu in somentorici doc. dr. Idi Poljanšek, za strokovno pomoč, usmerjanje, opombe in nasvete pri izdelavi diplomskega projekta.

Za pomoč pri eksperimentalnem delu in za vse nasvete glede meritev, bi se rad zahvalil dr. Viljemu Veku.

Zahvalil bi se tudi prof. dr. Marku Petriču za strokovno recenzuro.

Zahvala gre tudi vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri izdelavi, urejanju in oblikovanju diplomskega projekta.

