

**Nyugat-Magyarországi Egyetem**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A kémiai paraméterek szerepe a bükk (*Fagus sylvatica* L.)  
álgesztesedésében**

Hofmann Tamás

Sopron

2006

**Doktori Iskola:** Roth Gyula Erdészeti és Vadgazdálkodási  
Tudományok Doktori Iskola

**Tudományág:** Erdészeti és Vadgazdálkodási Tudományok

**Program:** Erdőgazdálkodás Biológiai Alapjai

**Témavezető:** Dr. Albert Levente egyetemi tanár

## 1. Előzmények és célkitűzés

A színes gesztesedés az élő bükk legfontosabb szerkezeti és szín anomáliája, amely a faállomány értékét jelentősen csökkenti és ezzel károsan hat a bükk termesztés gazdaságosságára. Bár az álgesztes faanyag tulajdonságai és ezek okán a felhasználhatósága alig különbözik az álgesztmentes bükkétől - elsősorban esztétikai-vizuális hibát jelent - bútorigari, belsőépítészeti, dekoratív területen csak korlátozottan alkalmazható. Ezért is fontos lenne felismerni az álló bükk törzsek közül az álgeszteseket és egy adott állományban az álgesztesedés mértékét. Erre nagyon sok próbálkozás történt, pl. roncsolásmentes kimutatási módszerek alkalmazása, vagy matematikai modellezés, melynek során olyan valószínűségi sűrűségfüggvények felírását próbálták megvalósítani a kutatók, melyek független változói a faegyed tulajdonságai (kor, mellmagassági átmérő, villásodás mértéke, kéregsérülések száma, stb.), eredményként pedig a faegyed álgesztesességének jövőbeni valószínűsége nyerhető. A gyakorlatban hasznosítható eredmények azonban váratnak magukra.

Az álgesztesedés okai és élettana, az álgeszt színanyagának kémiai szerkezete csak részben ismertek. Legtöbbször más, ismert és ugyancsak a faszövetek elszíneződésével járó folyamatok kutatási eredményeit próbálták - a hasonlóság okán - az álgesztesedés magyarázataként feltüntetni. A lejátszódó kémiai folyamatokhoz pontosan leírt szerkezetű molekuláris hordozókat és kémiai egyenletekkel szimbolizált vegyi folyamatokat csak a kioldható szénhidrátok esetében sikerült társítani. A kioldható szénhidrátok szerepe azonban csak közvetett, csupán prekursorjai lehetnek a színeképző vegyületeknek. Mindez megnehezíti az álgesztesedés visszaszorítására hivatott és az erdészeti tudomány és gyakorlat körébe tartozó eljárások és módszerek kidolgozását, valamint az álgesztes faanyag ipari felhasználási területeinek kiszélesítését pl. színhomogenizálással.

A szerző célja a bükk álgesztesedés kémiájának tanulmányozása volt, pontos, méréseken alapuló ismeretek szerzése a folyamat megértéséhez, a kémiai szereplők és folyamatok felderítésén keresztül.

Konkrét célok:

- Annak a kémiai környezetnek a tanulmányozása, amelyben a szöveti matrixban az álgesztesedés folyamatai zajlanak. A nedvességtartalom, a pH, a kötött-, a szabad- és az összes savtartalom, valamint a pufferkapacitás változásainak sugár irányú (a kéregtől a bélíg) és magasság szerinti vizsgálata.
- Az oxidoreduktáz enzimek, elsősorban a peroxidáz (POD) és polifenol-oxidáz (PPO) szerepének vizsgálata az álgesztesedés élettani folyamataiban. A szakirodalomban nem írták le a POD és PPO enzimek szerepét a bükk élettani folyamataiban, bár a POD szerepe ismert a kötelezően színesen gesztesedő fajok gesztesedésében és a növényi szövetek színesedésében.
- Bizonyítani, hogy a vörös álgeszt kialakulását nem farontó gombák okozzák.
- Tanulmányozni az összfenol tartalom sugárirányú és magasság szerinti változásait, a fenoloidok szerepét az álgesztesedésben. Elválasztani és azonosítani, majd konkrét fenoloidok esetében is vizsgálni a koncentrációik sugár- és magasságszerinti változásait. Azonosítani az álgeszt színeképző anyagainak képzésében résztvevő fenoloidokat.
- *In vitro* kísérletekben modellezni az álgeszt színyagainak képződését, párhuzamosan vizsgálva az enzim katalizált és enzim nélkül megvalósuló reakciókat.
- Összehasonlítani az álgesztes bükkből izolált és az *in vitro* kísérletekben előállított színes termékeket.

- Összevetni a bükk álgesztesedését a *Robinia*- és *Juglans*-típusú kötelező színes gesztesedéssel.

A szerző az álgesztes bükk vizsgálatánál nyert eredményeket azonos számú és azonos termőhelyről származó egészséges törzsre mért adatokkal vetette össze, hogy a különbségek - és ezen keresztül az álgesztesedés kémiai jellegzetességei - egyértelműen azonosíthatóak legyenek. A méréseket több éven keresztül, különböző termőhelyekről származó és eltérő klimatikus körülmények között élő bükk egyedekből vett mintákkal megismételte.

A kísérleti eredmények értelmezésénél figyelembe vette a kötelezően színesen gesztesedő erdei fák gesztesedésével kapcsolatos szakirodalmi adatokat is.

## **2. Kísérleti és vizsgálati módszerek**

### **2.1 Mintavétel és minta előkészítés**

A szerző a mérésekhez nagyszámú törzsből vett mintakorongokat használt, amelyeket 3 méter magasságból vett. Egy adott állományból 3 álgesztes és 3 álgesztmentes törzset választott ki. A kémiai paraméterek magasság szerinti eloszlásának vizsgálatához az álgesztes és álgesztmentes törzsekből méterenként vett mintát egészen az első villa magasságáig.

A kémiai paraméterek sugár irányú változásainak vizsgálatához a kéregtől a bél irányába haladva az álgesztes bükk korongokból nyolc, az álgesztmentesekből öt mintát vett. A különböző átmérőjű korongok összehasonlíthatóságát azzal biztosította, hogy a kijelölés a sugaraknak megfelelő arányban történt.

A mintakorongok a TAEG Rt. (Sopron) és a SEFAG Rt. (Kaposvár) különböző erdőterületeiről származtak. A mintavételi időpontok 1999-2005 között úgy kerültek megválasztásra, hogy a kötelező színes gesztesedés időszakába (július-január) essenek.

A felaprított minták extrakciója a vizsgálati cél és alkalmazott módszer figyelembe vételével (1) vízzel, (2) nátrium-acetáttal és (3) metanol:víz 4:1 arányú elegyével történt.

## 2.2 Vizsgált paraméterek és analitikai módszerek

**pH és savtartalom.** A pH és savtartalom (szabad-, kötött- és őrössav) meghatározása potenciometriás pH méréssel történt (NÉMETH, 1987).

**POD enzim aktivitás.** Az enzim aktivitásának mérése spektrofotometriásan történt 3,3'-diaminobenzidin szubsztrátummal. Abszorbancia mérés 480 nm-en (SHANNON és mtsai., 1966) módszere alapján.

**PPO enzim aktivitás.** Az enzim kétféle aktivitása közül a szerző a katekoláz aktivitást vizsgálta. Szubsztrátum: pirokatechin. Spektrofotometriás meghatározás, abszorbancia mérés 420 nm-en.

**Totálfenol tartalom mérés.** Folin-Ciocalteu módszerével (SINGLETON és ROSSI, 1965), standard: kvercetin.

### **Fenoloidok minőségi és mennyiségi meghatározása.**

A *katechinek* elválasztása és meghatározása vékonyréteg kromatográfiával történt. Állófázis: TLC szilikagél; Mozgófázis: 9:1 diizopropil-éter:hangyasav (FECKA és mtsai., 2001); Kamra: normál telítetlen kamra; Előhívás: vanillin-kénsav reagens (STAHL, 1962); Minőségi és mennyiségi kiértékelés: Camag TLC Scanner 3 denzitóméterrel, abszorpciók üzemmódban.

A *kvercetin*, *taxifolin* és *glikozidjaik* elválasztása és azonosítása túlnyomásos rétegekromatográfiás módszerrel történt. Állófázis: HPTLC szilikagél; Egymást követő kifejlesztés 6:3:1 toluol:etil-acetát:hangyasav (STAHL, 1962) majd 5:3:1:1 etilacetát:metil-etil-keton:hangyasav:víz mozgófázisokkal OPLC 50 túlnyomásos kamrában; Előhívás difenilbórsav- $\beta$ -aminoetilészterrel, és polietilén-glikol-4000 oldatokkal (STAHL, 1962). Minőségi és mennyiségi kiértékelés: Camag TLC Scanner 3 denzitométerrel fluoreszcenciás üzemmódban.

**A bükk fenoloidjainak és enzimjeinek *in vitro* reakciója.** Bükk enzimkivonat és az azonosított fenoloidok reagáltatása vizes közegben az álgeszt szöveteire jellemző pH-n (pH=6.2). A reakcióelegyek komponenseinek szétválasztása vékonyréteg kromatográfiával, a vizsgált fenoloidokhoz alkalmazott fázisrendszerrel, TLC szilikagél állófázison. Minőségi és mennyiségi kiértékelés és a termékek UV-VIS reflexiós spektrumának vizsgálata Camag TLC Scanner 3 denzitométerrel.

**Az álgeszt színanyagainak kémiai azonosítása.** Álgeszt színanyagainak extrakciója metanol:víz 4:1 arányú elegyével. Az extraktum komponenseinek szétválasztása vékonyréteg kromatográfiával a vizsgált fenoloidokhoz alkalmazott fázisrendszerrel, TLC szilikagél állófázison. A termékek UV-VIS reflexiós spektrumának vizsgálata Camag TLC Scanner 3 denzitométerrel.

**Cukrok minőségi és mennyiségi meghatározása.** Túlnyomásos rétegekromatográfiával. Állófázis: HPTLC szilikagél; Mozgó-fázis: 85:15 acetonitril:víz (SÁRDI és mtsai., 1996); Kifejlesztés: OPLC 50 túlnyomásos kamrában, 2 × 6000  $\mu$ l mozgófázissal (kétszeres kifejlesztés); Előhívás: 4 g difenil-amin + 4 ml anilin + 20 ml 86% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> reagenssel. Mennyiségi kiértékelés Camag TLC Scanner 3 denzitométerrel 540 nm-es hullámhosszon abszorpciós üzemmódban.

**Összcukortartalom.** A kioldható összecsukor tartalmát a vizsgált extraktumokból spektrofotometriásan határozta meg a szerző DuBOIS (1956) módszere alapján.

**Elektronmikroszkópos vizsgálatok.** A bükk faanyagának szöveti struktúráját pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgálta a szerző.

### **3. Az adatfeldolgozás és kiértékelés módszerei**

A szerző a mérési adatok összesítéséhez Microsoft Excel szoftvert alkalmazott, a kapott eredmények statisztikai elemzéséhez SPSS valamint Statistica 6.1 szoftvercsomagokat használt. A szoftverekkel végzett varianciánálízisben a *Tukey HSD* számolási módszert alkalmazta,  $p=0.05\%$ -os sziginifikancia szinten kivitelezve a vizsgálatot. Az adatok dokumentálásához Microsoft Word szövegszerkesztőt használt.

## **4. Új tudományos eredmények**

**4.1** A szerző elsőként bizonyította, hogy az oxidoreduktáz enzimeknek, jelesül a peroxidáznak (POD) és polifenol-oxidáznak (PPO) kiemelkedő szerepe van az álgesztesedés élettani folyamataiban.

- Vizsgálta a POD és a PPO aktivitásának pH szerinti változását. Kimutatta, hogy az álgeszt pH értékein (6.1-6.8) a PPO enzim fajlagosan aktívabb, mint a POD.
- Kimutatta, hogy a színhatáron a két enzim aktivitása ugrásszerűen megemelkedik és az álgeszt belsejében is jelentős marad. Ez ellentmond a kötelező színes gesztesedésnél tapasztaltakkal, ahol a színes geszt belsejéből semmilyen enzimaktivitás nem mutatható ki.



- Megállapította, hogy a bükkben a POD és PPO enzimek aktivitása minden szöveti részben arányos egymással, beleértve az álgesztes szöveteket is. Ebből azt a következtetést vonta le, hogy a bükkben a két enzimek funkció összefügg egymással, valószínűleg ugyanazok az izoenzimek látják el a kétfajta enzimek funkcióit ugyanúgy, mint a tölgyfajok esetében.
- Bizonyította, hogy a vörös álgeszt szöveteinek magas enzimaktivitása nem patológiás okokra vezethető vissza. Az enzimaktivitást mutató faszöveteken nem mutattak ki gombát. Ez alátámasztja azt a korábbi megállapítást, hogy a bükk vörös álgesztesedése fiziológiai folyamatok eredménye.

**4.2** A szerző az álgesztes bükk szövetekből öt fenoloid-glikozidot és négy fenoloidot választott el. Ezek közül azonosította a (+)-katechint, (-)-epikatechint, kvercetin és taxifolint. Hidrolízis után a glikozidok aglikonjaiként kvercetin és taxifolint talált.

- Kimutatta, hogy az öt kvercetin és taxifolin glikozid mennyisége a szíjácsban magas, mennyiségük a belső faszövetek felé haladva csökken mind az álgesztes, mind az álgesztmentes törzsekben.
- A glikozidok – a kötelező színes gesztesedéshez hasonlóan – a színhatáron hidrolizálnak és az álgeszt belsejében már csak a szabad aglikonok mutathatók ki.
- A színyanyagok a katechin epimérekéből keletkeznek, ezek koncentrációja a színhatár előtt magas, utána pedig nagymértékben csökken.
- A színes faanyag belsejében a szabad taxifolin és kvercetin akkumulálódik, szerepük az álgeszt színyanyagainak képződésében csekély.

**4.3** A szerző *in vitro* kísérletekben modellezte az álgeszt színyanyagainak képződését. Az oxidációt elvégezte mind a négy

fenoloiddal, párhuzamosan vizsgálva az enzimkatalizált és enzim nélkül megvalósuló reakciókat.

- Bizonyította, hogy a (+)-katechin és a (-)-epikatechin az álgeszt pH értékein a bükk enzimjeinek segítségével molekuláris oxigén hatására oxidációban és az azt követő polimerizációban átalakul. A reakció enzim nélkül is lejátszódik, de sokkal lassúbb és kismértékű a polimer képződés.
- Kimutatta, hogy a taxifolin azonos körülmények között enzimatikusan oxidálódik, de a reakció sebessége kicsi. Az átalakulás enzim nélkül is végbemegy, de a keletkezett termékek színe más. A taxifolin oxidatív átalakulása a katechinekhez képest lényegesen lassúbb.
- A kvercetin nem alakul át enzimtikus oxidációban és nem képez színes termékeket.

**4.4** A szerző összehasonlította az álgesztes bükkből izolált és a saját *in vitro* kísérleteiben előállított színes termékeket.

- Bizonyította, hogy az álgeszt színanyagai elsősorban a (+)-katechin és a (-)-epikatechin oxidált és polimerizált termékei.
- A taxifolin és kvercetin a lassú reakciók miatt akkumulálódik az álgesztes szövetekben.
- Feltételezhető, hogy e négy fenol és a belőlük keletkező oxidációs termékek egymás között is reagálnak. Az álgesztes bükk színanyaga keverék.
- Az *in vivo* és *in vitro* termékek közötti különbséget abban állapította meg, hogy a faanyagból izolált színanyag különböző polimerizációs fokú, több fenolos hidroxil- és kevesebb kinon-csoportot tartalmazó oligomér elegye, míg az alkalmazott kísérleti körülmények között zajló *in vitro* kísérletekben előállított elegy anyagaiban több a kinon- és kevesebb a fenolos-hidroxil csoport.

**4.5** Kísérleti eredményeiből a szerző arra következtetett, hogy a színanyagok képződése több tényező együttes hatásának az eredménye. Ezek között központi szerepet játszik a szöveti pH, a fenoloidok minősége és mennyisége, valamint az oxidoreduktáz enzimek mennyisége, ill. aktivitása.

Az oxigénnek a „száradó határzóna” utáni szövetekbe való bejutása az ott jellemzően megemelkedett pH értékekkel és a magas enzimaktivitásokkal együtt hoz létre olyan kémiai környezetet, amelyben az álgeszt színanyagainak kialakulása megtörténhet.

**4.6** A szerző bizonyította, hogy a bükk álgesztesedése a *Juglans*-típusú kötelező színes gesztesedéssel több ponton analóg:

- Az álgesztesedésben jelentősebb szerepet játszó fenoloidok (flavan-3-olok) mennyisége a szíjácstól a színhatárig folyamatos akkumulációt mutat.
- A színhatár előtt, a határzónában nem, vagy csak elenyésző mértékben játszódik le a gesztesítő fenolok *in situ* szintézise.
- A szacharóz akkumulációja és hidrolízise a határzónában kis mértékű.

## 5. Az eredmények alkalmazása

A kémiai anyagok, paraméterek és folyamatok szerepének felderítése a bükk álgesztesedésében alapkutató, a szerző kísérleti eredményei hozzájárulnak az élettani folyamat kémiai alapjainak felderítéséhez. Mindezen túl:

- megnyithatják az utat egy újabb roncsolásmentes vizsgálat, az álgesztesedés kémiai előrejelzése előtt,
- alapját képezhetik új erdőművelési módszerek kidolgozásának,
- elősegíthetik módszerek kidolgozását az álgesztes faanyag színének homogenizálására, a sötét sávokkal határolt zónák szíkontrasztjainak a kiegyenlítésére, a színtartósság növelésére.

## 6. Az értekezés témaköréből készült saját közlemények jegyzéke

### Szakfolyóirat cikkek

ALBERT, L. HOFMANN, T., NÉMETH, ZS. I., RÉTFALVI, T., KOLOSZÁR, J., VARGA, SZ., CSEPREGI, I. (2003): Radial variation of total phenol content in Beech (*Fagus sylvatica* L.) wood with and without red heartwood, *Holz als Roh- und Werkstoff* 61: 227-230.

HOFMANN, T., ALBERT, L., RÉTFALVI, T. (2004): Quantitative TLC Analysis of (+)-Catechin and (–)-Epicatechin from *Fagus sylvatica* L. with and without Red Heartwood, *Journal of Planar Chromatography* 17: 350-354.

ALBERT, L., HOFMANN, T., RÉTFALVI, T., NÉMETH, ZS. I., KOLOSZÁR, J., CSEPREGI, I. (2005b): A bükkálgeszt

kialakulásának kémiai folyamatai. A (+)-Katechin és (-)-Epikatechin szerepe, *Erdészeti Kutatások* 91: xxx-xxx (megjelenés alatt).

### **Konferencia előadások és poszterek**

ALBERT, L., NÉMETH, ZS. I., **HOFMANN, T.** (2000): Variation of the Chemical Parameters, Endogenous Formaldehyde Content and Catalase Activity in the Red-Heartwooded Beech (*Fagus Sylvatica* L.) Wood, 5<sup>th</sup> International Jubilee Conference on ROLE OF FORMALDEHYDE IN BIOLOGICAL SYSTEMS, 2000 október 9-13, Sopron. Poszter.

ALBERT, L., RÉTFALVI, T., **HOFMANN, T.**, VISI-RAJCZI, E., NÉMETH, ZS. I., BÖRCSÖK, E., KOLOSZÁR, J., VARGA, SZ., CSEPREGI, I. (2002b): The radial and vertical alteration of the pH and the acidity in the red-heartwooded beech (*Fagus sylvatica* L.), EASA Conference on Water, Environment and Health, 2002 október 18-19, Arad, Románia, Poszter.

### **Konferenciakötetekben megjelent összefoglalók**

ALBERT, L., **HOFMANN, T.**, VISI-RAJCZI, E., RÉTFALVI, T., NÉMETH, ZS. I., KOLOSZÁR, J., VARGA, SZ., CSEPREGI, I. (2002a): Relationships Among Total Phenol and Soluble Carbohydrate Contents And Activities of Peroxidase and Polyphenol Oxidase in Red-Heartwooded Beech (*Fagus sylvatica* L.), 7<sup>th</sup> European Workshop on Lignocellulosics and Pulp - Towards molecular-level understanding of wood, pulp and paper, 2002 augusztus 26-29, Turku/Abo, Finnország, pp. 253-256.

**HOFMANN, T.**, ALBERT, L., RÉTFALVI, T., BÁNYAI-STEFANOVITS, É., VISI-RAJCZI, E., BÖRCSÖK, E., NÉMETH, ZS. I., KOLOSZÁR, J., VARGA, SZ., CSEPREGI, I. (2002): A peroxidáz és polifenol-oxidáz enzimek aktivitásának sugárirányú vizsgálata az álgesztes bükkben (*Fagus sylvatica* L.), A Kémiai Intézet tudományos ülészaka, 2002 november 7., Sopron, pp. 102-106.

**HOFMANN, T.**, ALBERT, L., RÉTFALVI, T. (2004): Quantitative TLC Analysis of (+)-Catechin and (-)-Epicatechin from *Fagus sylvatica* L. with and without Red Heartwood, Planar Chromatography 2004, 2004. május 23-25, Visegrád, pp. 379-387.

RÉTFALVI, T., **HOFMANN, T.**, VISI-RAJCZI, E., TAKÁCS, P., ALBERT, L., MARKÓ, G. (2004): The acidity of red-hertwooded beech and its effects on the mechanical features of the chipboard, 7<sup>th</sup> European Workshop on Lignocellulosics and Pulp, 2004 Augusztus 23-25, Riga, Lettország, pp. 547-550.

ALBERT, L., **HOFMANN, T.**, RÉTFALVI, T., NÉMETH, ZS., KOLOSZÁR, J., VARGA, SZ., CSEPREGI, I. (2005a): A fenoloidok, a polifenol-oxidáz és a peroxidáz szerepe a bükkálgeszt kialakulásában, Erdő és fagazdaságunk időszerű kérdései - A MTA Erdészeti Bizottsága Kiadványa, Budapest, 2005. Szerk.: Solymos Rezső. pp. 161-176.

### **Kutatási jelentés**

A bükk (*Fagus sylvatica* L.) álgesztesedésének kémiai vizsgálata. OTKA T 043038 (2003-2004).