

BIORAFINERIJSKI POTENCIAL MANJVREDNEGA LESA RDEČEGA BORA (*Pinus sylvestris* L.) IN ROBINIJE (*Robinia pseudoacacia* L.) ZA PRIDOBIVANJE NARAVNIH BIOAKTIVNIH UČINKOVIN ZA ZAŠČITO LESA

BIOREFINERY POTENTIAL OF LOW-VALUE SCOTS PINE (*Pinus sylvestris* L.) AND BLACK LOCUST (*Robinia pseudoacacia* L.) WOOD FOR THE EXTRACTION OF NATURAL BIOACTIVE COMPOUNDS FOR WOOD PRESERVATION

Viljem VEK¹, Ida POLJANŠEK², Urša OSOLNIK³, Peter HROVATIČ⁴, Angela BALZANO⁵, Miha HUMAR⁶, Primož OVEN⁷

(1) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, viljem.vek@bf.uni-lj.si

(2) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, ida.poljansek@bf.uni-lj.si

(3) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, ursa.osolnik@bf.uni-lj.si

(4) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, peter.hrovatic@bf.uni-lj.si

(5) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, angela.balzano@bf.uni-lj.si

(6) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, miha.humar@bf.uni-lj.si

(7) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, primoz.oven@bf.uni-lj.si

IZVLEČEK

S prispevkom želimo predstaviti glavne rezultate in povzetek znanstvenih dognanj, do katerih smo prišli z dvema nacionalnima podoktorskima projektoma ob podpori takratnega Ministrstva za izobraževanje, znanost in šport Republike Slovenije (MIZŠ) ter Javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS). Analizirali smo biorafinerijski potencial manjvrednega lesa rdečega bora (*Pinus sylvestris* L.) in robinije (*Robinia pseudoacacia* L.) za ekstrakcijo naravnih bioaktivnih spojin. Les grč in jedrovine smo uporabili kot biomaso za ekstrakcijo polifenolnih ekstraktivov, ki smo jih nato uporabili v naravno osnovanih pripravkih za zaščito lesa. Rezultati so pokazali, da hidrofilni ekstraktivi grč bora in jedrovine robinije zavirajo glivni razkroj lesa in imajo velik potencial kot biocidne komponente in antioksidanti v naravno osnovanih zaščitnih pripravkih. Nadaljnje raziskave antioksidativnih in protiglivičnih lastnosti ekstraktivov lesa in skorje so v teku.

Keywords: robinija, rdeči bor, grče, les, manjvredna drevesna biomasa, ekstrakcija, polifenoli, naravni fungicidi in antioksidanti, biorafinerija, krožno biogospodarstvo

ABSTRACT

This article presents the key results and scientific findings from two national postdoctoral research projects supported by the Ministry of Education, Science and Sport of the Republic of Slovenia (MIZŠ) and the Slovenian Research and Innovation Agency (ARIS). We analyzed the biorefinery potential of low-value Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) wood for the extraction of natural bioactive compounds. Knotwood and heartwood were used as biomass for extracting polyphenolic compounds, which were subsequently applied in bio-based wood preservatives. The results showed that hydrophilic extractives from Scots pine knotwood and black locust heartwood inhibit fungal decay and demonstrate strong potential as biocidal components and antioxidants in natural wood protection formulations. Further research on the antioxidant and antifungal properties of wood and bark extractives is ongoing.

Ključne besede: black locust, Scots pine, knotwood, wood, low-value tree biomass, extraction, polyphenols, natural fungicides and antioxidants, biorefinery, circular bioeconomy

GDK 84=163.6

DOI 10.20315/ASetL.136.2

Received / Prispelo: 13. 01. 2025

Accepted / Sprejeto: 25. 03. 2025



1 UVOD

1 INTRODUCTION

Koncept krožnega gospodarstva obravnava stranske tokove proizvodnega procesa kot pomembne in neodvisne verige vrednosti (Oven P. in sod., 2023; Verkasalo E. in sod., 2019). Manjvredna drevesna biomasa, ostanke lesno-predelovalne industrije in les manj cenjenih oziroma manj uporabnih drevesnih vrst so pomembna

surovina za pridobivanje različnih bio-osnovanih produktov (Oleson K. R. in Schwartz D. T., 2016; Osolnik U. in sod., 2024). V to skupino uvrščamo tudi les mehaniko poškodovanih in fiziološko oslavljenih dreves ter les odlomljenih delov dreves, ki se je v naših gozdovih v bližnji preteklosti kopičil predvsem zaradi vremenskih ujm in napadov podlubnikov. Zaradi katastrofalnega žleda, ki je leta 2014 izredno močno prizadel naše goz-

dove, je bilo prizadetih pol milijona hektarov gozdov. Pri tem je nastalo okoli 9 milijonov m³ poškodovanega in uničenega lesa (slika 1). Leta 2016 je Slovenijo prizadel še uničujoč vetrolom, ki je poškodoval še približno 3 milijone kubičnih metrov lesa, v letih med 2015 in 2020 pa smo se spopadali z gradacijo lubadarja (Jaime L. in sod., 2024; Nagel T. A. in sod., 2016). Pričakujemo, da bodo podobne ujme v gozdovih divjale tudi v prihodnosti. Ob iskanju možnosti rabe manjvredne drevesne biomase so trenutno velike pozornosti deležne tudi nekatere tujerodne drevesne vrste, ki pri nas dobro uspevajo in so v primerjavi z avtohtonimi vrstami odpornejše proti klimatskim spremembam (Dyderski M. K. in sod., 2018; Humar M. in sod., 2022; Vítková M. in sod., 2017). Biomasa klimatsko odpornejših drevesnih vrst tako izkazuje velik aplikativni potencial, zato lahko pričakujemo vstop in vse pomembnejšo vlogo teh vrst v gozdno-lesni verigi pri nas.

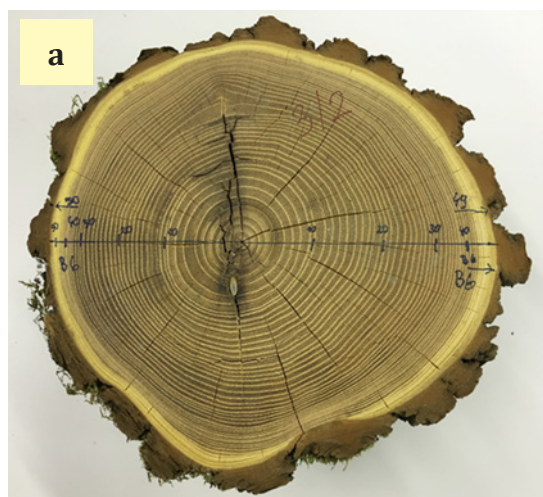
V raziskavah valorizacije manjvredne drevesne biomase smo z dvema podoktorskima projektoma, ki sta potekala pod pokroviteljstvom takratnega Ministrstva za izobraževanje, znanost in šport Republike Slovenije (MIZŠ, št. projekta 6316-9/2015-142) ter Javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS, št. projekta ARRS-ZAPOSŁ-MDR 39/2015), predstavili inovativen način uporabe manjvrednega lesa, pri čemer smo se osredotočili na dve drevesni vrsti, rdeči bor (*Pinus sylvestris* L.) in robinijo (*Robinia pseudoacacia* L.). Pri tem smo les grč rdečega bora in jedrovino robinije uporabili kot naraven vir biološko aktivnih spojin, le-te pa smo nato, tudi v kombinaciji s celuloznimi nanofibrilami (CNF), uporabili v naravno osnovanih zaščitnih pripravkih za

les. V lesarstvu je les, ki vsebuje veliko grč, nezaželen. Grče se v lesarstvu običajno vrednotijo kot tehnološka napaka, z nekaterimi izjemami, kjer lahko prispevajo k estetski vrednosti tega naravnega materiala. Grče so na splošno ostanek v lesno predelovalni industriji. Poznan in dokazan je negativen vpliv grč iglavcev na proizvodnjo celuloze in kakovost papirja (Holmbom B., 2011). Grče se najpogosteje uporabljajo le kot energent. Ob tem je izredno pomenljivo, da grče veljajo za enega najbogatejših virov naravnih polifenolov v naravi, še posebej grče rdečega bora so dokazano bogat vir fenolnih ekstraktivov z biocidnimi in antioksidantnimi lastnostmi (Belt T. in sod., 2017; Harju A. M. in Venäläinen M., 2006; Poljanšek I. in sod., 2019; Willför S. in sod., 2003). Robi nija na drugi strani velja za tujerodno listnato drevesno vrsto, ki zelo dobro uspeva na evropskih tleh (Brus R. in sod., 2019), vendar njen les v lesnopredelovalni industriji ni optimalno izkoriščen. Vzrok za to so tudi neugodne biometrične lastnosti debla robinije, ki pogosto ni ravno, prav tako so premeri debel relativno majhni. Velik aplikativni potencial robinije podpira dejstvo, da izrazito največji delež debla sestavlja prav naravno zelo odporna jedrovina. Beljava na prečnem prerezu debla pri adultnem drevesu zajema le od 6-7 branik (slika 2a). Les robinije se je v preteklosti zaradi svoje visoke naravne odpornosti največkrat uporabljal za uporabo na prostem, npr. kot koli v sadovnjakih in vinogradih (slika 2b) (Reinprecht L. in sod., 2010; Vítková M. in sod., 2017). Fenolni ekstraktivi, ki so karakteristični za les grč rdečega bora oziroma za jedrovino robinije (slika 3), to so stilbeni (pinosilvin in pinosilvin monometilni eter) in flavonoidi (flavanol dihidrorobinetin in flavonol robinetin), izkazujejo



Slika 1: Primestni gozd Rožnik, Ljubljana: Drevesa rdečega bora (*Pinus sylvestris* L.) smo vzorčili nekaj mesecev po katastrofalnem žledu, ki je leta 2014 prizadel Slovenijo. S številkami 1-6 so na sliki označena poškodovana drevesa rdečega bora, ki smo jih vključili v raziskavo (Vek V. in sod., 2021b) (foto: V. Vek).

Fig. 1: Rožnik suburban forest, Ljubljana: Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees were sampled a few months after the catastrophic ice storm that struck Slovenia in 2014. The numbers 1-6 in the image indicate the damaged Scots pine trees included in the study (Vek V. et al., 2021b) (photo: V. Vek).



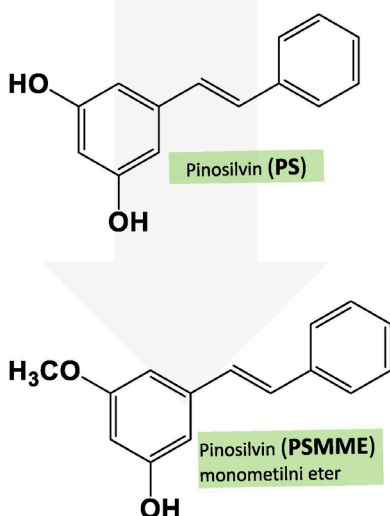
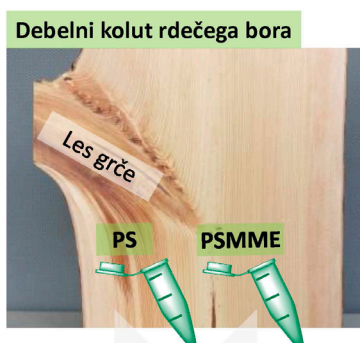
Slika 2: (a) Prečni prerez debla robinije, največji delež debla sestavlja jedrovina. (b) Koli robinije (*Robinia pseudoacacia* L.) so še vedno v uporabi, na sliki vinograd iz okolice Vogrskega (Vek V. in sod., 2021b) (foto: V. Vek).



Fig. 2: (a) Cross-section of a black locust stem, showing that the largest portion of the stem consists of heartwood. (b) Black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) poles are still in use; the image shows a vineyard in the Vogrsko area (Vek V. et al., 2021b) (photo: V. Vek)

protiglivne, antibakterijske in antioksidativne lastnosti (Lu J. R. in sod., 2016; Magel E. in sod., 1994; Rademacher P. in sod., 2016; Välimaa A.-L. in sod., 2007; Vek V. in sod., 2020a).

Kemijsko je les sestavljen iz treh osnovnih strukturnih gradnikov, iz celuloze, lignina in hemiceluloz. Sintaza teh naravnih polimerov med nastankom lesa/ksilogenezo je eden izmed razlogov, zaradi katerih je



Slika 3: Strukturne formule pinosilvinov in robinetinov, ki so v velikih količinah v grčah in jedrovini (Vek V. in sod., 2022b) (foto: V. Vek)

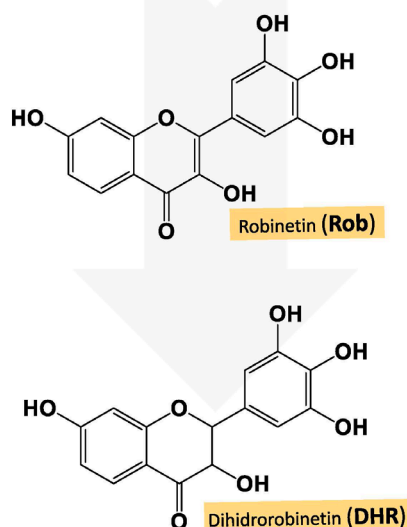
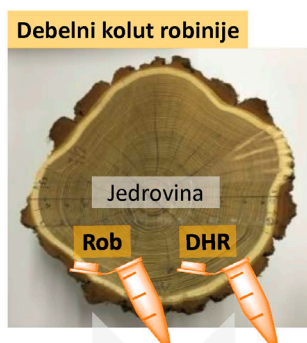


Fig. 3: Structural formulas of pinosylvins and robinetins, which are present in high concentrations in knotwood and heartwood (photo: V. Vek)

les obnovljiv in trajnosten material, hkrati pa je tudi biološko razgradljiv, kar lahko interpretiramo bodisi kot prednost bodisi slabost (Ragauskas A. J. in sod., 2006). Biorazgradljivost lesa v uporabi lahko preprečimo oziroma upočasnimo z izbiro naravno odpornih lesnih vrst, življenjsko dobo lesa lahko znatno podaljšamo tudi z ustrezno vgradnjo oziroma z ustreznimi konstrukcijskimi rešitvami. Bolj rigorozen pristop za zaščito lesa je termična in kemična modifikacija ter impregnacija lesa z zaščitnimi pripravki (Hill C. A. S., 2011; Miebach F., 2018; Pitman A., 2017). Biocidi, ki se uporabljajo v komercialno dostopnih zaščitnih sredstvih, lahko na različne načine inhibirajo glivni razkroj lesa. Pri tem najpogosteje inhibirajo glivni razvoj z vplivom na prepustnost celičnih membran ali inaktivacijo zunajceličnih glivnih encimov (Valette N. in sod., 2017). Zaščitni pripravki za les so pogosto osnovani na bakru z dodatkom kobiodida, ki nadzoruje glive, tolerantne na baker, v preteklosti pa so vsebovali tudi nevarne spojine, kot so npr. arzen, dikloran, kreozot (Freeman M. H. in McIntyre C. R., 2008; Kirker G. T. in sod., 2024). Sintetični biocidi tako pogosto pomenijo nevarnost za okolje in ljudi, zato so številni izmed njih že prepovedani za komercialno uporabo ali pa bodo prepovedani v bližnji prihodnosti (Singh T. in Singh A. P., 2012). Iskanje ustrezne alternative oziroma zamenjava sintetičnih in nevarnih biocidov z naravnimi bioaktivnimi spojinami je pomembnejši cilj na raziskovalnem področju (Barbero-López A. in sod., 2021; Dian-Qing Y., 2009; Singh T. in Singh A. P., 2012). Polifenoli manjvredne drevesne biomase rdečega bora in robinije so s svojimi antioksidativnimi in fungitoksičnimi lastnostmi vsekakor velik potencial kot zelena biocidna alternativa za zaščito lesa.

S tem prispevkom želimo predstaviti pregled rezultatov in glavne izsledke raziskav, ki smo jih napravili v okviru dveh podoktorskih projektov (MIZŠ 2013 in

ARRS 2015). S projektnimi aktivnostmi smo preverili, ali so ekstraktivi lesa rdečega bora in robinije primerni kot naravne biocidne učinkovine v pripravkih za zaščito lesa (Poljanšek I. in sod., 2019; Vek V., 2015, 2017; Vek V. in sod., 2020a; Vek V. in sod., 2021b; Vek V. in sod., 2022b; 2020b; Vek V. in sod., 2019a, 2020c; Vek V. in sod., 2019b). Ta prispevek je pregled glavnih rezultatov in izsledkov, do katerih smo prišli z dvema zaključenima podoktorskima projektoma. Osrednja cilja projektnih aktivnosti sta bila (1) ovrednotiti biorafinerijski potencial različnih debelnih tkiv rdečega bora oziroma robinije za pridobivanje in ekstrakcijo naravnih bioaktivnih ekstraktivov, kar smo podprli s kemijskimi analizami, ter (2) empirično ovrednotiti antioksidativne in protiglivične lastnosti pridobljenih ekstraktivov lesa z in vitro raziskavami.

2 MANJ VREDNA LESNA BIOMASA ZA PRIDOBIVANJE BIOAKTIVNIH SPOJIN

2 LOW-VALUE WOODY BIOMASS FOR THE EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS

2.1 Vzorčenje lesne biomase rdečega bora in robinije

2.1 Sampling of woody biomass from Scots pine and black locust

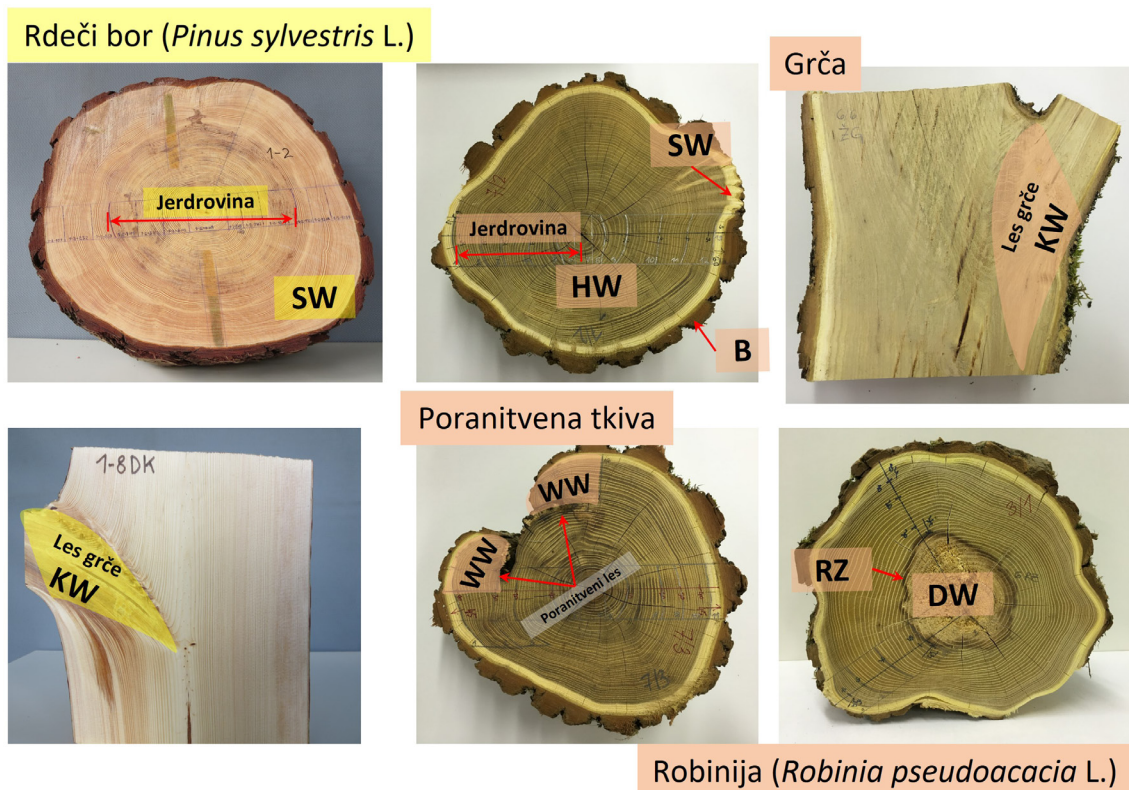
V podoktorske projektne aktivnosti smo vključili rdeči bor (*Pinus sylvestris* L.) in robinijo (*Robinia pseudoacacia* L.). Z raziskavami smo se osredotočili na lesno biomaso najnižje kakovosti, pri čemer smo analizirali biorafinerijski potencial lesa odlomljenih delov in mehansko poškodovanih dreves rdečega bora ter lesa komercialno nezanemljive in manj uporabljene robinije. Razvrsteno lesno biomaso najnižje kakovosti smo tako uporabili kot naraven vir oziroma surovino za pridobivanje dragocenih ekstraktivov z antioksidativnimi in protiglivičnimi lastnostmi. Postopek vzorčenja



Slika 4: (a) Odvzem vzorčnih kolutov z debla rdečega bora (*Pinus sylvestris* L.) na Rožniku v Ljubljani in (b) vzorčenje debel robinije v primestnem gozdu Panovec pri Novi Gorici (foto: V. Vek)



Fig 4.: (a) Sampling of stem discs from a Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trunk at Rožnik, Ljubljana, and (b) sampling of black locust trees in the Panovec suburban forest near Nova Gorica (photo: V. Vek)



Slika 5: Iz debelnih kolotov rdečega bora (*Pinus sylvestris* L.) in robinije (*Robinia pseudoacacia* L.) smo odvzeli vzorce zdravih in poranitvenih lesnih tkiv ter skorje. Vzorčili smo beljavo (SW), jedrovino (HW), skorjo (B), Grčo (KW), poranitveni les (WW), reakcijsko cono (RZ) in delno razkrojen les (DW) (Vek V., 2015; Vek V. in sod., 2020c) (foto: P. Oven in V. Vek).

Fig. 5: Samples of healthy and wound-healing wood tissue and bark were taken from stem discs of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). We sampled sapwood (SW), heartwood (HW), bark (B), knotwood (KW), wound wood (WW), reaction zone (RZ) and partially decayed wood (DW) (Vek V., 2015; Vek V. et al., 2020c) (photo: P. Oven in V. Vek).

dreves rdečega bora (*Pinus sylvestris* L.) in robinije (*Robinia pseudoacacia*) je podrobneje opisan v naših objavljenih poročilih (Vek V. in sod., 2020b; Vek V. in sod., 2020c). Za vsako preučevano drevesno vrsto smo posekali več adultnih dreves. Rdeči bor smo vzorčili v primestnem gozdu Rožnik v Ljubljani (46° 03' 31.3" N 14° 29' 32.1" E) (slika 1), robinijo pa v primestnem gozdu Panovec pri Novi Gorici (45° 56' 46.8" N 13° 40' 05.1" E). Vsa vzorčena drevesa rdečega bora so bila polomljena zaradi žledenja, ki je v mesecu februarju leta 2014 močno prizadelo slovenske gozdove (ZGS 2014). V raziskavo smo vključili vzorce lesa iz stoječega debla in les iz odlomljenega vrha (Vek V., 2015; Vek V. in sod., 2020c). Na drugi strani so bila drevesa robinije zdrava in intaktna, le eno vzorčeno drevo je imelo poškodovano deblo, kar nam je omogočilo vzorčenje poranitvenih tkiv in analizo vpliva poškodbe na vsebnost ekstraktivov v teh tkivih (Vek V. in sod., 2019a; Vek V. in sod., 2019b). Iz vzorčenih debel smo izžagali več 15 cm debelih debelnih kolotov (slika 4), le-te smo prepeljali na Oddelek za lesarstvo Biotehniške fakultete.

Vzorce lesa in grč smo iz debelnih kolotov vzorčili v mizarški delavnici na Oddelku za lesarstvo Biotehni-

ške fakultete (slika 5). Pri tem smo prečne in vzdolžne prereze kolotov rdečega bora in robinije najprej obdelali na poravnalnem skobeljnem stroju, na poravnanih površinah smo nato prešteli število branik in ocenili starost dreves, nato smo na kolutih označili še mesta odvzema vzorcev. Iz označenih kolotov rdečega bora in robinije smo s tračno žago (slika 6a) izžagali vzorce skorje (B), beljave (SW) in jedrovine (HW) in lesa grč (KW), iz diskov poškodovanih delov debla robinije smo vzorčili tudi poranitveni les (WW), reakcijsko cono (RZ), delno razkrojen les (DW) (slika 5). Vzorce lesa iz debel dreves s pripravo odvzetih vzorcev za kemijske analize je potekalo skladno s standardnim protokolom TAPPI, T257 cm-02 (Vzorčenje in priprava lesa za analizo) in T264 cm-97 (Priprava lesa za kemično analizo). Glede na zahtevnost samega vzorčenja z izolacijo posameznih tkiv lesa iz debelnih kolotov pa so bile potrebne manjše modifikacije pri izvajanju protokola. Pripravljene bloke lesa in skorje smo nato prek noči sušili pri $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ v laboratorijskem sušilniku, s čimer smo zmanjšali vpliv nezaželenih biokemijskih reakcij na vsebnost polifenolov v materialu (Makkar H., 2003; Tilley A. in sod., 2023). Pred ekstrakcijo smo

vzorke rdečega bora in robinije dezintegrirali z rezalnim mlinom, dezintegrirane vzorce lesa pa nato posušili v liofilizatorju pri 4 Pa in -82 °C.

Ob relativno zamudnem in dolgotrajnem načinu vzorčenja in izolacije lesnih tkiv iz debelnega koluta na tračnem žagalnem stroju (slika 6b) se je hitro porodila ideja o hitrejšem in enostavnejšem načinu odvzema vzorcev lesa debela za kemijske analize. Samo idejo smo realizirali nekoliko kasneje, pri tem smo les iz kolotov vzorčili s svedrom za les (Vek V. in sod., 2024c). Rezila svedra je treba pred uporabo očistiti z organskim topilom (npr. etanol ali aceton), s tem preprečimo vnos nečistoč v vzorec. Sveder smo vpeli v ročni akumulatorski vrtalnik, sledilo je vrtnanje v les na predhodno označenem mestu za odvzem vzorca (slika 6c). V primerjavi z razrezom lesa debelnih kolotov na tračnem žagalnem stroju je vzorčenje z lesnim svedrom natančnejše (slika

6d), hitrejša in tudi varnejša, saj raziskovalec ni izpostavljen rezilom tračnih in formatnih lesnoobdelovalnih strojev. Velika prednost vzorčenja lesa s svedrom je tudi ta, da pred ekstrakcijo ni potrebna dodatna dezintegracija lesnih kosov na laboratorijskem mlinu. Po vzorčenju lesa s svedrom moramo pred ekstrakcijo vzorce le še posušiti, npr. v liofilizatorju, kot omenjeno zgoraj (Vek V. in sod., 2024c).

2.2 Ekstrakcija lesa in grč ter pridobivanje bioaktivnih polifenolov

2.2 Extraction of wood and knots and recovery of bioactive polyphenols

Ustrezna izbira ekstrakcijske metode za učinkovito pridobivanje ekstraktivov iz lesa in skorje dreves je odvisna od številnih faktorjev, npr. od drevesne vrste, od predpriprave in oblike materiala, od želenega produk-

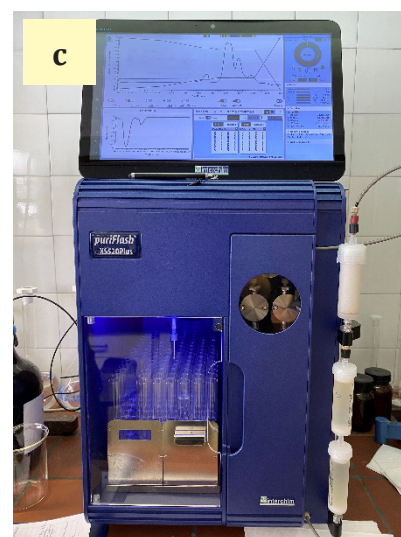


Slika 6: (a) Vzorčenje lesa iz debelnega koluta in (b) vzorčenje jedrovine robinije v radialnem nizu s tračnim žagalnim strojem. (c, d) Vzorčenje lesa debela in grč s svedrom. Vzorčenje lesa iz (c) kolotov s svedrom je predvsem hitrejša v primerjavi z (a) razžagovanjem kolotov na tračnem žagalnem stroju. Na sliki (d) vidna sled svedra, s katerim smo vzorčili temno obarvana in z ekstraktivi impregnirana lesna tkiva veje (foto: P. Oven in V. Vek).

Fig. 6: (a) Sampling wood from a stem disc and (b) radial sampling of black locust heartwood using a band saw. (c, d) Sampling stemwood and knotwood using a drill. Sampling wood from (c) discs with a drill is significantly faster than (a) sawing the discs with a band saw. Image (d) shows the the drill trace used to sample the dark coloured, extractive-rich wood tissue of the branch (photo: P. Oven and V. Vek).

ta oziroma kemijske strukture ekstraktivov, ki jih želimo pridobiti, in seveda od predvidene uporabe (Vek V. in Oven P., 2011; Willför S. M. in sod., 2006). Številni literaturni podatki pričajo o tem, da se za učinkovito ekstrakcijo lesa in skorje uporabljajo različne konvencionalne in napredne ekstrakcijske tehnike. Vzorci lesa in skorje se lahko ekstrahirajo z različno polarnimi organskimi topili, npr. v aparatu Soxhlet ali s postopkom maceracije, uporablja se tudi ultrazvočna ekstrakcija (UAE, ang. Ultrasound Assisted Extraction) in ekstrakcija z mikrovalovi (MAE, ang. Microwave Assisted Extraction) (Hofmann T. in sod., 2015a; Luque de Castro M. D. in Priego-Capote F., 2010; Meullemiestre A. in sod., 2016). Manj pogosti načini so ekstrakcija s superkritičnimi fluidi ter encimsko podprte in fermentacijske ekstrakcijske tehnike in metode (Atwi-Ghaddar S. in sod., 2023; Chemat F. in sod., 2017; Wang Y. in sod., 2017). Pri izbiri ekstrakcijske tehnike je pogosto pomembno tudi to, da je sam postopek oziroma ekstrakcijski proces mogoče prenesti na višji tehnološki nivo. Pilotne ekstrakcijske metode, ki se na industrijskem nivoju uporabljajo za ekstrakcijo polifenolov iz drevesne biomase, temeljijo na ekstrakciji materiala s topili pri povišani temperaturi in tlaku (Domazet M. in sod., 2023; Vek V. in sod., 2022c). V naših podoktorskih projektih smo liofilizacijsko posušene vzorce lesa rdečega bora in robinije ekstrahirali v aparatu Soxhlet (Vek V. in sod., 2019a). S preliminarnimi analizami smo vzorce ekstrahirali tudi z drugimi ekstrakcijskimi tehnikami, torej ultrazvočno ekstrakcijo, ekstrakcijo z magnetni-

mi mešali in s sistemom za pospešeno ekstrakcijo (Vek V., 2017; Vek V. in sod., 2019a). V aparatu Soxhlet (slika 7a) smo ekstrahirali vzorce beljave (SW), jedrovine (HW), lesa grč (KW) in skorje (B), le-ta tkiva smo ekstrahirali za obe preučevani drevesni vrsti, pri robiniji pa smo ekstrahirali še poranitvena lesna tkiva z vzorci poranitvenega lesa (WW), reakcijske cone (RZ) in delno razkrojenega lesa (DW) (slika 5). Pridobivanje polifenolov iz lesa in skorje je potekalo z vodno raztopino acetona (Dünisch O. in sod., 2010; Willför S. in sod., 2003). Grče smo predhodno ekstrahirali s cikloheksanom, s tem smo iz vzorcev odstranili lipofilno ekstraktibilno frakcijo s smolnatimi spojinami. Vse pridobljene acetonske ekstrakte smo kemijsko analizirali z gravimetrijo, s spektrofotometrijo in kromatografijo, kar bomo bolj natančno opisali v nadaljevanju. Za namene izvedbe glivnih testov smo pripravili homogeniziran ekstrakt borove grče (KWE, ang. akronim za hydrophilic knotwood extract) in homogeniziran ekstrakt jedrovine robinije (HWE, ang. akronim za hydrophilic heartwood extract). Vzorca hidrofilnih ekstraktov KWE in HWE so tvorili volumski alikvoti vseh ekstraktov grč in jedrovine, ki smo jih pridobili s Soxhlet-ekstrakcijo. V glivne teste smo poleg vzorcev KWE in HWE vključili tudi ciljne spojine borovih grč in jedrovine robinije, ki imajo dokazano bioaktivne lastnosti, torej pinosilvin (PS), pinosilvin monometilni eter (PSMME) ter dihidrorobinetin (DHR) in robinetin (Rob) (Vek V. in sod., 2020b).



Slika 7: (a) Ekstrakcija odvzetih vzorcev lesa rdečega bora (*Pinus sylvestris* L.) in robinije (*Robinia pseudoacacia* L.) je potekala v aparatu Soxhlet. Ekstrakcijski proces smo podprli s (b) sistemom za pospešeno ekstrakcijo Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350. (c) LC sistem Interchim puriFlash PF-XS 520 Plus avtomatsko frakcioniranje in purifikacijo ekstraktov skorje in lesa (foto: V. Vek).

Fig. 7: (a) Extraction of collected wood samples from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) using a Soxhlet apparatus. The extraction process was supported by a (b) Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 accelerated extraction system. (c) Interchim puriFlash PF-XS 520 Plus LC system used for automated fractionation and purification of bark and wood extracts (photo: V. Vek)..

HWE in KWE smo pridobili tudi z ekstrakcijo z naprednim sistemom Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 (slika 7b), pri tem je ekstrakcija vzorcev potekala v STT (stainless steel) ekstrakcijskih celicah pri nadtlaku 10,34 MPa in temperaturi 100 °C (Vek V. in sod., 2021a). Poleg hidrofilnih ekstraktov grč in jedrovine smo v biološka testiranja vključili tudi očiščene ekstrakte, spojini DHR in Rob smo komercialno pridobili na trgu, medtem ko smo PS in PSMME iz ekstraktov grč rdečega bora izolirali sami, in sicer po metodi, ki so jo predlagali Poljanšek I. in sod. (2019). Na kratko, PS in PSMME smo iz ekstraktov ločili s kolonsko flash kromatografijo, pri tem smo uporabili neklorirana topila, sama ločba pa je potekala na izbranem silikagelu (Poljanšek I. in sod., 2019). Metoda za purifikacijo ekstraktov je bila učinkovita, kontrolo kakovosti oziroma čistosti izoliranih spojin pa smo opravili z analizo HPLC-PDA (Vek V. in sod., 2020b). Za namen čiščenja in purifikacije ekstraktov lesa in skorje dreves smo pred kratkem pridobili tudi LC sistem Interchim puriFlash PF-XS 520 Plus za avtomatsko frakcioniranje in purifikacijo ekstraktov, ta sodobni in avtomatizirani sistem je opremljen s kvarterno LC črpalko, komoro za avtomatsko zbiranje frakcij ter UV detektorjem, sistem omogoča ločbo na normalni in reverzni stacionarni fazi (slika 7c). Sistem je izredno pomembna pridobitev in nadgradnja obstoječe analitske infrastrukture na Oddelku za lesarstvo, saj nam omogoča pridobivanje in pripravo visoko kvalitetnih polifenolnih ekstraktov lesa in skorje. Rezultate preliminarne analize, ki smo jih napravili na puriFlash sistemu, bomo predstavili z enim izmed naših prihodnjih prispevkov.

2.3 Kvalitativna in kvantitativna kemijska analiza ekstraktivov

2.3 Qualitative and quantitative chemical analysis of extractives

V vzorcih lesa rdečega bora in robinije smo v prvem koraku gravimetrično izmerili vsebnost celokupnih ekstraktivov (TEC, ang. Total Extractive Content), nato smo vzorce spektrofotometrično analizirali na vsebnost polifenolov (TPC, ang. akronim za Total Polyphenol Content), s kromatografsko metodo pa smo v vzorcih rdečega bora izmerili še vsebnost pinosilvina (PS, mg/g) in pinosilvin monometilnega etra (PSMME, mg/g), v vzorcih robinije pa vsebnost dihidrorobinetina (DHR, mg/g) in robinetina (Rob, mg/g). Rezultate kemijskih analiz smo izrazili kot miligram ekstraktivov na gram posušenega vzorca (mg/g, dw).

TEC v vzorcih smo gravimetrično izmerili tako, da smo ekstrakt sušili v laboratorijskem sušilniku s temperaturnim programom od 60 do 105 °C do konstante

mase (Vek V. in sod., 2019a). TPC v vzorcih lesa smo analizirali kolorimetrično skladno z nekoliko modificiranim protokolom Singletona in Rossija (1965). Pri tem smo ekstraktom vzorcev lesa dodali vodno raztopino Folin-Ciocalteu fenolnega reagenta in vodno raztopino natrijevega karbonata. Po inkubaciji smo reakcijskim zmesem z instrumentom UV-Vis (Perkin Elmer, Lambda) izmerili absorbanco pri valovni dolžini 765 nm. Kot referenčno spojino za semi-kvantitativno vrednotenje polifenolov v vzorcih smo uporabili galno kislino. Kolorimetrična metoda je bila linearna v izbranem koncentracijskem območju ($R^2 > 0.99$), rezultate smo izrazili v masnih ekvivalentih galne kisline na gram suhega vzorca (mg GAE/g dw) (Vek V. in sod., 2013b; Vek V. in sod., 2019a).

Natančno kvalitativno in kvantitativno analizo ekstraktov in analizo ciljnih spojin v ekstraktih bora in robinije, torej pinosilvina (PS) in pinosilvin monometil etra (PSMME) ter dihidrorobinetina (DHR) in robinetina (Rob), smo opravili na sistemu za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC, Thermo Scientific Accela). S sistemom HPLC smo napravili tudi kontrolo kakovosti in kvalitativno analizo vseh testnih raztopin, ki smo jih vključili v biološke teste. Ločba ekstraktivov je potekala na C18 kromatografski koloni (4.6 ID × 150 mm, 2.6 µm), ekstrakte smo s kolone eluirali gradientno z metanolom in vodo ter jih detektirali s fotodi odnim detektorjem (PDA) pri valovni dolžini 280 nm. S PDA detektorjem smo za ločene spojine merili tudi spektre, in sicer v območju od 200 do 400 nm. Kvalitativna analiza je potekala s primerjavo retencijskih časov in posnetih UV spektrov ločenih spojin s časi in spektri izbranih referenčnih standardov (ESTD). Natančno kvantitativno analizo smo napravili z umeritvenimi krivuljami za izbrane ESTD, HPLC-PDA metoda je bila za vse ESTD linearna v izbranem koncentracijskem območju ($R^2 > 0.99$). Rezultate kvantitativne HPLC-PDA analize smo izrazili na gram suhega vzorca (mg/g dw). O sami metodologiji za kemijsko analizo ekstraktivov v grčah rdečega bora in jedrovini robinije natančneje poročamo v Vek in sod. (2020a; 2022a; 2019a, 2020c).

2.4 Protiglivna aktivnost ekstraktivov rdečega bora in robinije

2.4 Antifungal activity of extractives from Scots pine and black locust

In vitro protiglivni testi se pogosto opravljajo tako, da se bioaktivne spojine dodajo v hranilno gojišče, glivna inhibicija pa se nato izmeri z merjenjem premera micelija. Slaba stran tega načina je ta, da se lahko v eni petrijevki analizira le en vzorec na protiglivni efekt

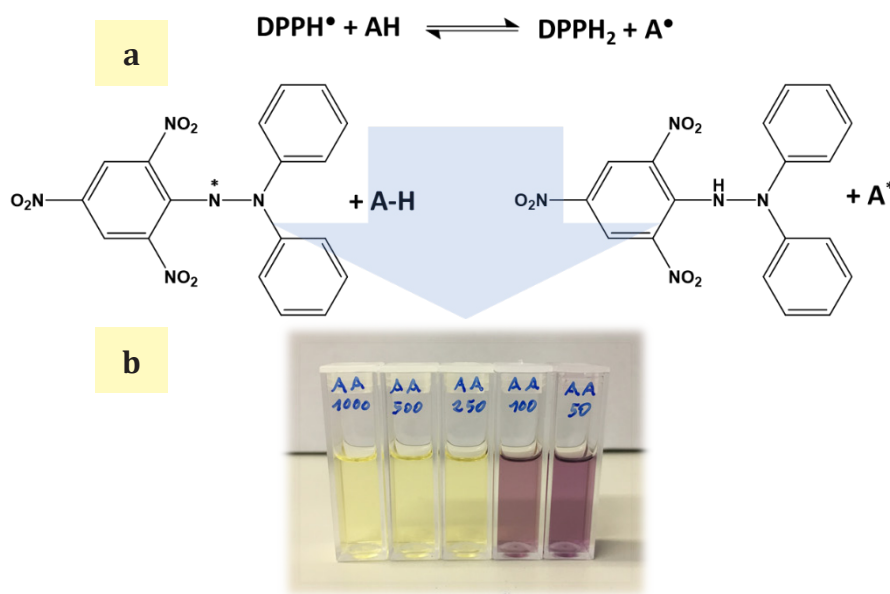
(Celimene C. C. in sod., 1999; Chen P.-S. in sod., 2014; Seppänen S. K. in sod., 2004). V našem primeru smo predstavili metodo, ki je ena izmed *in vitro* načinov za hitro in zanesljivo merjenje inhibicije glivne rasti za dva ali več vzorcev hkrati (Fernandes C. in sod., 2017; Lindberg L. E. in sod., 2004; Vek V. in sod., 2013a). Inhibicijo glivne rasti smo merili z difuzijsko metodo na hranilnem gojišču z luknjami (Vek V. in sod., 2020b). Pri tem smo z luknjačem v hranilno gojišče (PDA, potato dextrose agar) naredili luknje s premerom 8 mm, v le-te pa smo vnesli točno 1 mg čiste substance, torej pinosilvina (PS), pinosilvin monometilnega etra (PSM-ME), dihidrorobinetina (DHR) in robinetina (ROB) ter 1 mg hidrofilnega ekstrakta rdečega bora in robinije v 1 % in 5 % koncentraciji (v/w). Delo je potekalo v sterilnih razmerah v laminariju, vse raztopine z ekstrakti smo pripravili v dimetil sulfoksidu (DMSO). Pripravljenе petrijevke smo nato inokulirali z izbranimi testnimi glivami bele (*Trametes versicolor* and *Schizophyllum commune*) in rjave trohnobe (*Gloeophyllum trabeum* and *Fibroporia vaillantii*). Inokulirane petrijevke smo nato postavili v rastne komore, inkubacija je potekala pri $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 75 % relativni zračni vlažnosti. Razvoj testnih gliv razkrojevalk lesa smo spremljali vsak drugi dan, pri tem smo v radialni smeri merili razdaljo med obodom luknje s testnim mestom za ekstrakte in glivnim micelijem. Poskus smo ustavili takrat, ko je

micelij prerastel do roba petrijevke. Rezultate protiglivnega testa smo izrazili v procentih inhibicije glivne rasti (IN, the percentage inhibition of fungal growth in the centrifugal direction) (Vek V. in sod., 2020a; Vek V. in sod., 2020b).

2.5 Antioksidativna kapaciteta ekstraktivov rdečega bora in robinije

2.5 Antioxidant capacity of extractives from Scots pine and black locust

Antioksidativno kapaciteto ekstraktov rdečega bora in robinije smo analizirali *in vitro* z merjenjem antioksidativne kapacitete z metodo DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ki se pogosto uporablja za merjenje antioksidativne kapacitete rastlinskih ekstraktov (Hofmann T. in sod., 2015b; Tavčar Benković E. in sod., 2014; Vek V. in sod., 2024a). Kot referenčne antioksidante smo uporabili galno kislino (GA), askorbinsko kislino (AA) in butilhidroksianizol (BHA), vzorce referenčnih standardov in ekstraktov KWE in HWE smo analizirali v petih testnih koncentracijah. Ekstraktom rdečega bora in robinije smo dodali metanolno raztopino DPPH, reakcijsko zmes smo nato 30 min inkubirali v temni komori pri sobnih razmerah. Ko antioksidant odda vodikov atom ali elektron prostemu DPPH radikalu, se tvori reducirana oblika difenilpikrilhidrazin (slika 8a). Ta kemijski proces opisujemo kot odstranjevanje



Slika 8: Antioksidativno kapaciteto ekstraktivov grčrdečega bora in jedrovine robinije smo analizirali z DPPH testom. (a) Pri mešanju raztopine DPPH z antioksidantom, ki lahko odda vodikov atom ali elektron, se tvori reducirana oblika difenilpikrilhidrazin (DPPH₂). (b) Pri tem se reakcijska zmes obarva iz vijolične v svetlo rumeno bravo. Antioksidativna kapaciteta različno koncentriranih raztopin askorbinske kisline (foto: V. Vek).

Fig. 8: The antioxidant capacity of Scots pine knotwood and black locust heartwood extractives was analyzed using the DPPH assay. (a) When a DPPH solution is mixed with an antioxidant capable of donating a hydrogen atom or an electron, the reduced form diphenylpicrylhydrazine (DPPH₂) is formed. (b) As a result, the reaction mixture changes color from violet to light yellow-brown. Antioxidant capacity of ascorbic acid solutions of varying concentrations (photo: V. Vek).

radikalov (Molyneux P., 2004) in ga lahko spremljamo kolorimetrično, saj se z redukcijo DPPH radikalov vijo-lična reakcijska zmes razbarva v svetlo rumeno barvo (slika 8b). To barvno spremembo reakcijske zmesi smo analizirali spektrofotometrično (Perkin Elmer Lambda UV-Vis) z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 517 nm. Antioksidativno kapaciteto vzorcev smo izrazili kot aktivnost oziroma sposobnost odstranjevanja DPPH radikala (RSA, DPPH radical scavenging activity) (Vek V. in sod., 2020a).

2.6 Impregnacija biološko manj odpornega lesa z ekstraktivi rdečega bora in robinije

2.6 Impregnation of biologically less durable wood with extractives from Scots pine and black locust

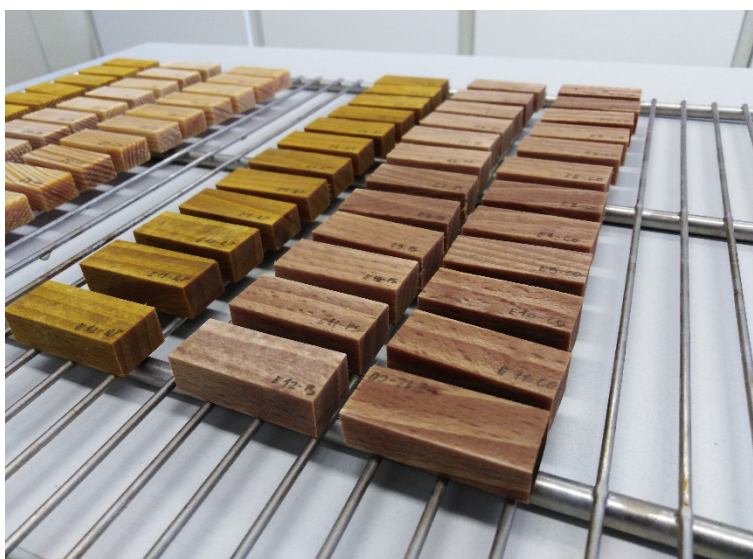
Za izvedbo protiglivnega testa smo uporabili les manj odpornih drevesnih vrst iglavcev in listavcev, pri tem smo z ekstraktivi impregnirali beljavo rdečega bora (*Pinus sylvestris* L.) in beljavo navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.). Borovino in bukovino smo impregnirali s pripravki s KWE in HWE v tlačno-vakuumski komori (Kambič, Semič, Slovenija), po postopku polnih celic, ki je natančneje opisan v Vek V. in sod. (2020a). Po impregnaciji smo impregnirane količke lesa (slika 9) sušili v laboratorijskem sušilniku pri $T = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$ do konstante mase. Za kontrolo smo uporabili količke, ki smo jih impregnirali z destilirano vodo. Odpornost impregniranega lesa bora in bukve na glivni razkroj smo ovrednotili z mini blok testom, ki je modificiran standardni protokol EN 113 (CEN, 2006) (Humar M. in Thaler N., 2017; Zimmer K. in Melcher E., 2017). S tem testom smo analizirali vpliv impregnacije z eks-

traktivi na odpornost lesa na glivni razkroj. Sam test smo napravili *in vitro*, v sterilne petrijevke s PDA hranilnim gojiščem smo cepili inokulum glive bele in rjave trohnobe. Ko je micelij testnih gliv prerastel do oboda oziroma roba petrijevke, smo v petrijevke položili avtoklavirane impregnirane količke lesa. Petrijevke z vzorci lesa smo za protiglivni test pripravljali v sterilnih razmerah v laminariju. Petrijevke z vzorci smo inkubirali v rastnih komori pri $T = 25^{\circ}\text{C}$ in 80 % relativni zračni vlagi, inkubacija je trajala 12 tednov. Vzorce lesa smo pred in po izpostavitvi delovanju gliv razkrojevalk lesa analizirali z gravimetrično metodo, rezultate testa odpornosti na glivni razkroj pa izrazili kot izgubo mase (ML) (Vek V. in sod., 2020a).

2.7 Analiza učinkovitosti impregnacije z ekstraktivi

2.7 Analysis of the effectiveness of impregnation with extractives

Učinkovitost postopka impregnacije lesa z ekstraktivi ter retencijo KWE rdečega bora in HWE robinije v lesnem matriksu smo preiskali mikroskopsko s konfokalnim laserskim vrstičnim mikroskopom (CLSM, Olympus OLS5000) in elektronskim vrstičnim mikroskopom (SEM, Fei, Quanta 250). Za CLSM mikroskopiranje neimpregniranega in z ekstraktivi impregniranega lesa smo uporabili več objektivov (MPL-FLN5xLEXT, MPLFLN10xLEXT, MPLAPON20xLEXT in MPLAPON50xLEXT), CLMS mikrofotografije so posneti s pomočjo avtofluorescence in polarizirane svetlobe. Pred SEM analizo smo posušene vzorce namestili na nosilce s prevodnim grafitnim trakom, vzorce lesa smo napašili z zlatom v Au/Pd nanašalniku. SEM mikrofotografije



Slika 9: Leseni količki po impregnaciji z ekstraktivi borove grče (*Pinus sylvestris* L.) in jedrovine robinije (*Robinia pseudoacacia* L.) (foto: V. Vek)

Fig. 9: Wood blocks after impregnation with extractives from Scots pine knots (*Pinus sylvestris* L.) and black locust heartwood (*Robinia pseudoacacia* L.) (photo: V. Vek)

smo snemali z elektronskim vrstičnim mikroskopom FEI Quanta 250 SEM, mikroskopija je potekala v visokem in nizkem vakuumu na delavni razdalji 9 - 11 mm (slika 10). Navzem oziroma zadrževanje KWE in HWE v impregniranem lesu smo kvantitativno ovrednotili z gravimetrično metodo. Pri tem smo vzorce lesa pred in po impregnaciji sušili do konstantne teže (Humar M. in Lesar B., 2008), količino ekstrakta, ujetega v lesu, smo izrazili z odstotkom povečanja mase vzorca (%) (Vek V. in sod., 2020a; Vek V. in sod., 2022a).

3 EKSTRAKTIVI MANJ VREDNE LESNE BIOMASE KOT VIR NARAVNIH ANTIOKSIDANTOV IN PROTIGLIVNIH SPOJIN

3 EXTRACTIVES OF LOW-VALUE WOODY BIOMASS AS A SOURCE OF NATURAL ANTIOXIDANTS AND ANTIFUNGAL COMPOUNDS

Rezultati in diskusija, ki sledijo v nadaljevanju, so povzetek naših že objavljenih izvirnih znanstvenih člankov. V nadaljevanju bomo pregledali rezultate in najpomembnejša dognanja našega znanstveno raziskovalnega dela. Ta pregled omogoča vpogled v ključne ugotovitve, ki so bile pridobljene skozi naše raziskave, ter poudarja pomembnost rezultatov.

3.1 Biometrične lastnosti vzorčenih dreves rdečega bora in robinije

3.1 Biometric properties of sampled trees of Scots pine and black locust

Vzorčena drevesa rdečega bora so bila v povprečju visoka 23,43 m ($\pm 0,81$ SD), povprečni premer na prsni višini je znašal 41,42 cm ($\pm 2,85$ SD), drevesa so bila v povprečju stara 193,33 leta ($\pm 12,24$ SD). Višina debla po odlomu vrha je v povprečju znašala 16,37 m ($\pm 3,96$ SD) (slika 1). V primestnem gozdu Panovec smo vzorčili drevesa robinije, stara od 49 do 70 let, visoka od 21

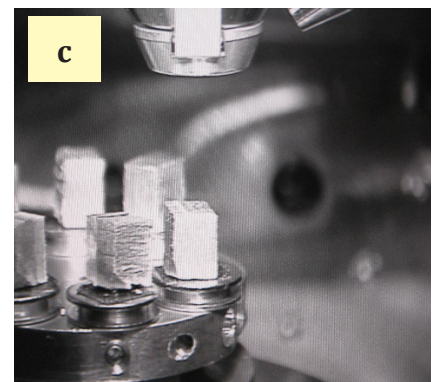
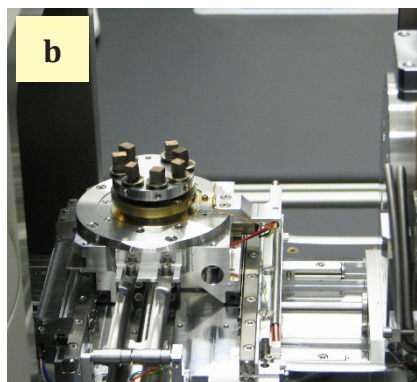
do 24 m, premer debla je na prsni višini znašal od 22 do 28 cm (Vek V., 2015; Vek V. in sod., 2020c).

3.2 Vsebnost ekstraktivov v lesni biomasi rdečega bora in robinije

3.2 Content of extractives in the woody biomass of Scots pine and black locust

Ekstrakte smo iz lesa grč rdečega bora in jedrovine robinije ekstrahirali z acetonom, nato smo ekstrakte preiskali gravimetrično, spektrofotometrično in kromatografsko. Vzorce rdečega bora smo pred ekstrakcijo z acetonom ekstrahirali tudi s cikloheksanom, s čimer smo odstranili smolnate spojine, ki lahko motijo potek nadaljnjih kemijskih analiz. Pri tem smo ugotovili, da je v lesu rdečega bora v cikloheksanu topnih več spojin kot v acetonu. Izmerili smo, da so vzorci borovih grč v povprečju vsebovali 6,9 % hidrofilnih ekstraktivov in kar 17,8 % lipofilnih ekstraktivov, torej je bilo lipofilnih ekstraktivov v teh vzorcih skoraj 3-krat več kot hidrofilnih ekstraktivov. Nadaljnja analiza kemijske sestave hidrofilnega ekstrakta je pokazala, da večji delež ekstrahiranih polifenolov pripada stilbenom (Poljanšek I. in sod., 2019; Vek V. in sod., 2021b; Vek V. in sod., 2020b).

Pri robiniji smo podrobneje kemijsko okarakterizirali ekstrakte v več različnih kategorijah lesa debla in v skorji, rezultate komparativne analize prikazuje preglednica 1 (Vek V. in sod., 2019a, 2020c; Vek V. in sod., 2019b). Ugotovili smo, da največ hidrofilnih ekstraktivov v deblu robinije vsebuje jedrovina (HW) in les vej oziroma grč (KW). Nadaljnja analiza je pokazala značilno radialno variabilnost v vsebnosti celokupnih ekstraktivov (TEC), polifenolov (TPC) in flavonoidov (DHR) (slika 11), pri čemer smo najvišje vsebnosti polifenolov izmerili v perifernih (adultnih) delih jedrovine, značilno nižje količine ekstraktivov so vsebovali



Slika 10: Z ekstraktivi impregnirane vzorce lesa smo preiskali s CLMS in (a) SEM mikroskopskimi tehnikami. Pred SEM analizo smo (b) poravnane površine vzorce prevlekli z zlatom, (c) SEM mikroskopiranje orientiranih vzorcev smo opravljali pri nizkem in visokem podtlaku (foto: V. Vek).

Fig. 10: Wood samples impregnated with extractives were analysed using CLMS and (a) SEM microscopy. Prior to SEM analysis, (b) the aligned sample surfaces were coated with gold, and (c) SEM microscopy of oriented samples was performed under low and high vacuum (photo: V. Vek).

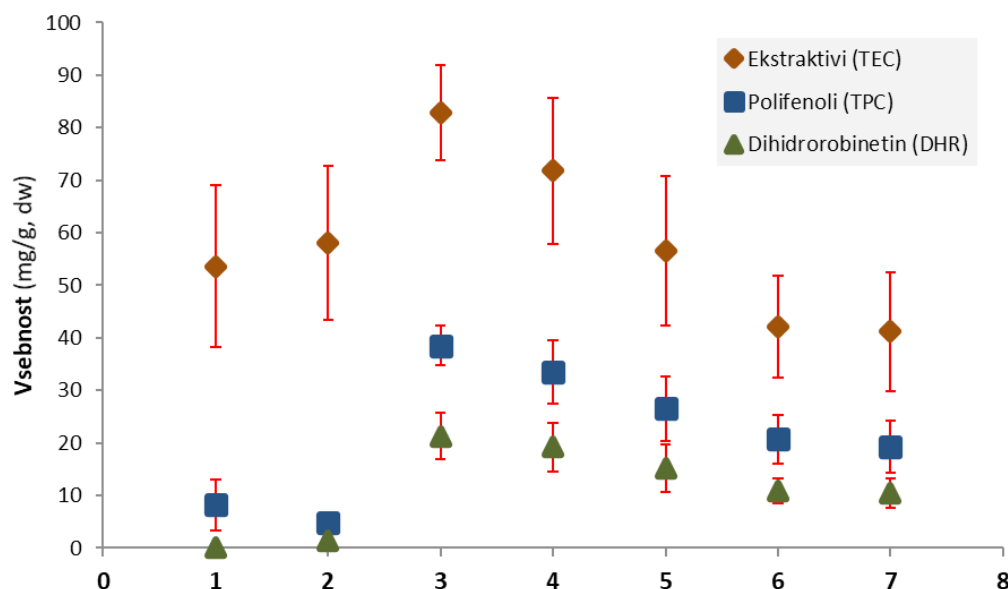
Preglednica 1: Vsebnost celokupnih ekstraktivov (TEC), polifenolov (TPC), dihidrorobinetina (DHR) in robinetina (Rob) v vzorcih skorje in lesa robinije (*Robinia pseudoacacia* L.). B-skorja, SW-beljava, HW-jedrovina, WW-poranitveni les, RZ-reakcijska cona, DW-delno razkrojeni les, KW-les grče. Razlike v vsebnosti ekstraktivov med preučevanimi vzorci smo statistično ovrednotili s testom ANOVA in LSD (test najmanjše pomembne razlike) (Vek V. in sod., 2020c).

Vzorec	Celokupni ekstraktivi (TEC, mg/g dw)			Polifenoli (TPC, mg GAE/g dw)			Dihidrorobinetin (DHR, mg/g dw)			Robinetin (Rob, mg/g dw)		
	avg	SD	LSD	avg	SD	LSD	avg	SD	LSD	avg	SD	LSD
B	53,62	15,43	ab	8,22	4,82	a	0,11	0,04	a	0,51	0,17	a
SW	58,07	14,67	ab	4,94	1,93	a	1,50	1,10	a	1,45		ab
HW	60,53	20,56	bc	28,05	9,52	b	15,71	5,87	c	3,93	2,30	b
WW	81,80	1,72	c	38,34	3,65	c	22,85	6,75	d	4,46	2,36	b
RZ	60,19			27,39		b,c	20,33			1,71		
DW	23,58			0,54		a	0,24					
KW	63,32	7,10	bc	29,02	3,23	b,c	11,96	2,68	b	3,44	1,88	b

Table 1: Total extractives content (TEC), total polyphenol content (TPC), dihydrorobinetin (DHR) and robinetin (Rob) in bark and wood samples of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). B-bark, SW-sapwood, HW-heartwood, WW-wound wood, RZ-reaction zone, DW-partially decayed wood, KW-knotwood. Differences in extractives content between the analysed samples were tested for statistical significance using ANOVA and the LSD test (least significant difference) (Vek V. et al., 2020c).

centralni deli jedrovine z juvenilnimi tkivi in strženom (Vek V. in sod., 2020c). Pomembna ugotovitev kemijskih analiz, ki smo jih napravili na vzorcih robinije, je tudi ta, da so visoke vsebnosti polifenolov v lesu, ki je lokaliziran v bližini mehanskih poškodb in razkroja (preglednica 1). Lesna tkiva okoli mesta poškodovanja zajemajo tudi tako imenovano reakcijsko cono (RZ) in

poranitveni les (WW). RZ in WW nekako ohranjata integriteto funkcionalnih lesnih tkiv z zaščito prevodnih in skladiščnih procesov, ki potekajo v intaktnem lesu poškodovanega drevesa (Oven P. in sod., 1999; Vek V. in sod., 2014). Nasprotno, najnižje vsebnosti polifenolov smo izmerili v beljavi in delno razkrojenem lesu (preglednica 1).



Slika 11: Radialna variabilnost v vsebnosti hidrofilnih ekstraktivov (TEC), polifenolov (TPC) in dihidrorobinetina (DHR) v deblu robinije (*Robinia pseudoacacia* L.). Skorjo in les debla smo vzorčili v radialnem nizu, od periferije debla proti strženu. Vsebnost ekstraktivov smo izmerili v vzorcih skorje (B), beljave (SW) in v več vzorcih jedrovine (HW1 – HW5). Jedrovino smo vzorčili glede na starost, od zunanjih/adultnih tkiv (HW1) do notranjih/juvenilnih tkiv s strženom (HW5) (Vek V. in sod., 2020c).

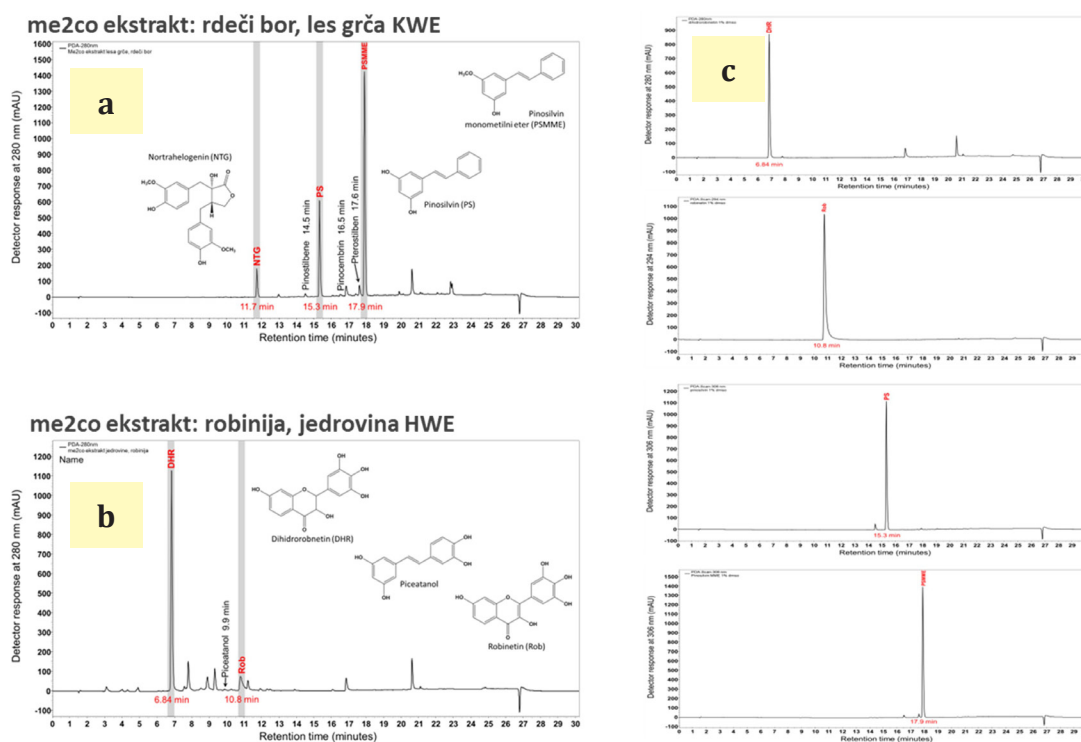
Fig. 11: Radial variability of the content of hydrophilic extractives (TEC), polyphenols (TPC) and dihydrorobinetin (DHR) in the stem of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). Bark and wood samples were collected along a radial axis from the periphery of the stem towards the pith. Extractive content was measured in bark (B), sapwood (SW) and several heartwood samples (HW1 – HW5). Heartwood samples were taken based on age, ranging from the outer/adult tissue (HW1) to the inner/young tissue with pith (HW5) (Vek V. et al., 2020c).

Podrobno kemijsko analizo sestave ekstraktov rdečega bora in robinije smo napravili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). HPLC kromatogrami jasno kažejo, da so stilbeni in lignani karakteristični polifenoli v acetonskem ekstraktu borove grče (slika 12a), v teh smo s kromatografijo kvalitativno ovrednotili stilbena pinosilvin (PS) in pinosilvin monometilni eter (PSMME) ter lignan nortrahelogenin (NTG) (Poljanšek I. in sod., 2019; Poljanšek I. in sod., 2015). V manjših količinah se iz vzorcev lesa grč ekstrahirajo še pinostilben, pterostilben in pinocembrin (Vek V. in sod., 2020a; Vek V. in sod., 2020b). Za acetonske ekstrakte lesa robinije so bili značilni flavonoidi, v večjih količinah smo iz jedrovine robinije ekstrahirali flavanonol dihidrorobinetin (DHR) in flavonol robinetin (Rob), v sledovih smo detektirali tudi stilben piceatanol (slika 12b). S kvantitativnimi spektrofotometričnimi in kromatografskimi metodami smo dokazali, da polifenoli opisujejo velik delež topnih snovi v hidrofilnih ekstraktibilnih frakcijah rdečega bora in jedrovine

robinije (Vek V. in sod., 2020a; Vek V. in sod., 2020b).

Homogenizirani vzorec grč rdečega bora (KWE) je tako v povprečju vseboval 10,6 mg/g PS in 17,7 mg/g PSMME, z ekstrakcijo vzorca jedrovine robinije (HWE) pa smo v povprečju pridobili 4,5 mg/g robinetina Rob in 17,8 mg/g DHR (Vek V. in sod., 2020a). S HPLC analizo smo preverili tudi kvaliteto ekstraktov in čistih fenolnih ekstraktivov lesa, preden smo jih izpostavili delovanju gliv razkrojevalk lesa. Ugotovili in potrdili smo, da so testni bio-osnovani pripravki vsebovali visoke vsebnosti stilbenov in flavonoidov (slika 12a in slika 12b). Uporabljena HPLC metoda nam je omogočila učinkovito kromatografsko ločbo ciljnih polifenolnih ekstraktivov (slika 12c).

Rezultati naših kemijskih analiz so jasno potrdili, da je lahko les slabše kakovosti, skupaj z grčami in lesom poškodovanih dreves, ustrezna surovina za pridobivanje bioaktivnih polifenolov (Vek V. in sod., 2021b; Vek V. in sod., 2022a). Ena izmed najpomembnejših ugotovitev naših raziskav je, da tudi les odlomljenih



Slika 12: HPLC kromatogrami (a) ekstrakta lesa grče rdečega bora (*Pinus sylvestris* L.) (KWE) in (b) ekstrakta jedrovine robinije (*Robinia pseudoacacia* L.) (HWE). (c) Kromatografska metoda nam je omogočila učinkovito ločbo ciljnih polifenolov: DHR, dihidrorobinetin, retencijski čas ali čas zadrževanja molekul spojine na koloni (tr) = 6,8 min; Rob, robinetin, tr = 10,8 min; PS, pinosilvin, tr = 15,3 min; PSMME, pinosilvin monometilni eter, tr = 17,9 min. (Vek V. in sod., 2020c).

Fig. 12: HPLC chromatograms of (a) Scots pine knotwood extract (*Pinus sylvestris* L.) (KWE) and (b) black locust heartwood extract (*Robinia pseudoacacia* L.) (HWE). (c) The chromatographic method enabled efficient separation of the target polyphenols: DHR, dihydrorobinetin, retention time of the compound on the column (tr) = 6.8 min; Rob, robinetin, tr = 10.8 min; PS, pinosilvin, tr = 15.3 min; PSMME, pinosilvin monomethyl ether, tr = 17.9 min (Vek V. et al., 2020c).

delov dreves, ki lahko več mesecev leži na gozdnih tleh, vsebuje relevantne količine polifenolov za njihovo ekstrakcijo (Vek V. in sod., 2020b).

3.3 Antioksidativna kapaciteta ekstraktov lesa rdečega bora in robinije

3.3 Antioxidant capacity of Scots pine and black locust wood extracts

Z analizo antioksidativnih lastnosti smo preverili aplikativni potencial ekstraktov lesa rdečega bora in robinije kot naravnih antioksidantov. Rastlinski polifenoli so dandanes pogosto predmet intenzivnih znanstvenih raziskav, predvsem zaradi svojih edinstvenih kemijskih lastnosti in številnih koristi za zdravje (Cory H. in sod., 2018; Montoya L. F. in sod., 2024). Naravni polifenoli so dokazano spojine, ki nevtralizirajo proste radikale (nestabilne molekule, ki lahko poškodujejo celice in DNK), tako da donirajo vodikove atome ali elektrone. S tem dokazano preprečujejo oksidativni stres, ki je povezan s staranjem in boleznimi, kot so rak, sladkorna bolezen in srčno-žilne bolezni. S svojo raznoliko kemijsko strukturo lahko nevtralizirajo različne vrste prostih radikalov in reaktivnih kisikovih spojin (ROS), kar povečuje njihovo antioksidativno moč, lahko pa delujejo npr. tudi v sinergiji z drugimi antioksidanti, kot sta npr. vitamin C in vitamin E (Cory H. in sod., 2018; D'Andrea G., 2010; Shalaby E. A. in Shanab S. M. M., 2013; Vek V. in sod., 2024a).

Rezultati kolorimetrične metode DPPH (Hofmann in sod., 2015; Vek in sod., 2024a), s katero smo ekstraktom spektrofotometrično izmerili antioksidativno kapaciteto, so pokazali, da so ekstraktivi jedrovine robinije (HWE) dobri lovci prostih DPPH radikalov

Preglednica 2: Antioksidativna kapaciteta (RSA, %)* hidrofilnih ekstraktivov lesa grč (KWE) rdečega bora (*Pinus sylvestris* L.) in jedrovine (HWE) robinije (*Robinia pseudoacacia* L.) ter referenčnih antioksidantov (BHA, GA, AA)**. Razlike v antioksidativni kapaciteti med preučevanimi vzorci smo statistično ovrednotili s testom ANOVA in LSD (test najmanjše pomembne razlike) (Vek V. in sod., 2020a).

Masna koncentracija mg/L	Butilhidroksianizol (BHA) *RSA, %			Galna kislina (GA) *RSA, %			Askorbinska kislina (AA) *RSA, %			Grča rdečega bora (KWE) *RSA, %			Jedrovina robinije (HWE) *RSA, %		
	avg	SD	LSD	avg	SD	LSD	avg	SD	LSD	avg	SD	LSD	avg	SD	LSD
1000	95,55	0,09	m,n,o	95,54	0,01	m,n,o	96,55	0,08	o	30,50	0,80	h	94,68	0,46	m
500	92,14	0,22	i	95,46	0,01	m,n,o	96,34	0,30	n,o	18,17	0,04	d	95,14	0,02	m,n
250	74,73	0,79	k	95,50	0,01	m,n,o	92,56	3,40	i	9,80	0,27	c	92,95	0,69	i
100	42,35	0,07	i	94,91	0,06	m	28,15	0,33	g	2,83	0,35	b	41,66	1,15	i
50	23,71	0,36	f	66,74	0,51	j	8,45	0,08	c	0,43	0,09	a	21,16	1,21	e

*Antioksidativno kapaciteto vzorcev smo izrazili kot aktivnost oziroma sposobnost odstranjevanja DPPH radikala (RSA %, radical scavenging activity).

** GA; galna kislina. AA; askorbinska kislina. BHA; butilhidroksianizol

(preglednica 2). S komparativnimi analizami smo med seboj primerjali antioksidativno kapaciteto hidrofilnih ekstraktivov grč rdečega bora (KWE) in hidrofilnih ekstraktivov jedrovine robinije (HWE). V številnih poročilih je natančno navedeno, da ekstraktivi lesa rdečega bora izkazujejo biocidne in antioksidativne učinke (Holmbom B., 2011; Pietarinen S. in sod., 2006; Välimaa A.-L. in sod., 2007; Willför S. M. in sod., 2003), manj literaturnih podatkov na to temo obstaja za ekstraktive lesa robinije (Hosseinihashemi S. K. in sod., 2016; Rademacher P. in sod., 2016; Smith A. L. in sod., 1989). Ugotovili smo, da so ekstraktivi lesa robinije značilno boljši lovci prostih radikalov kot ekstraktivi grč rdečega bora (preglednica 2). V primerjavi z referenčnimi antioksidanti, torej z galno (GA) in askorbinsko kislino (AA) ter butilhidroksianizolom (BHA), so se ekstraktivi robinije (HWE) izkazali kot dobri antioksidanti tudi pri nižjih koncentracijah testnih raztopin (preglednica 2).

3.4 Protiglivne lastnosti ekstraktivov grč bora in jedrovine robinije

3.4 Antifungal properties of pine knotwood and black locust heartwood

Glavni oziroma osrednji cilj omenjenih podoktorskih projektov je bil enostavno pridobiti biološke aktivne ekstraktive iz necenjene lesne biomase ter nato z lesnimi ekstraktivi impregnirati manj odporne lesne vrste in izboljšati njihovo odpornost proti glivnemu razkroju (Vek V., 2015; Vek V. in sod., 2024b). S projektnimi aktivnostmi smo poskušali osnovati zaščitni pripravek za les na osnovi bioaktivnih lesnih ekstraktivov ter s tem predstaviti alternativo sintetičnim in okolju nevarnim biocidom. Z raziskavami smo sledili načelom

Table 2: Antioxidant capacity (RSA, %)* of hydrophilic extracts from the knotwood (KWE) of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and the heartwood (HWE) of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.), along with reference antioxidants (BHA, GA, AA)**. Differences in antioxidant capacity between the tested samples were statistically evaluated using ANOVA and the LSD test (least significant difference) (Vek V. et al., 2020a).

evropskega zelenega dogovora z upoštevanjem konceptov zelenega in krožnega biogospodarstva (Oven P. in sod., 2023; Tamantini S., 2023; Tamantini S. in sod., 2021).

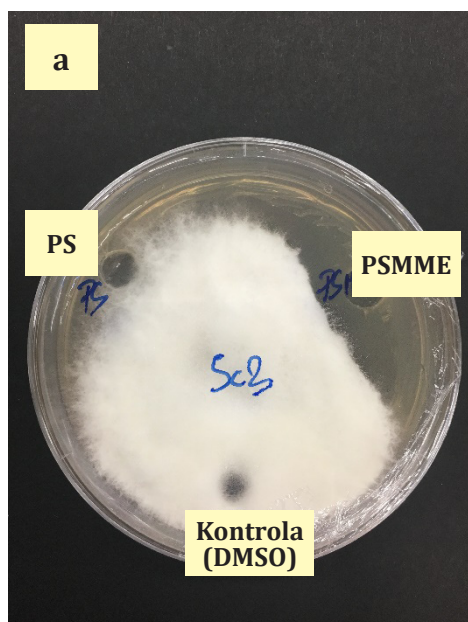
3.4.1 Inhibicija rasti gliv z ekstraktivi lesa

3.4.1 Inhibition of fungal growth with wood extractives

Inhibicijo glivnega razvoja z lesnimi ekstraktivi smo izmerili z *in vitro* difuzijsko metodo na hranilnem gojišču z luknjami. V prvem koraku smo s preliminar-nimi testi poskusili dve nestandardni metodi (Humar M. in Pohleven F., 2007), in sicer smo inhibicijo glivne rasti analizirali z metodo s celuloznimi nosilci ter metodo, kjer smo ekstraktive direktno nanесли na hranilno gojišče, v predhodno pripravljena izvrtine, ki smo jih izdelali s kovinskim luknjačem (ang. well diffusion method). Rezultati te komparativne analize še niso bili objavljeni. Obe metodi sta že bili uporabljeni na raziskovalnem področju in sta dokazano primerni za analizo fungicidnega potenciala ekstraktivov drevesne biomase (Celimene C. C. in sod., 1999; Chen P.-S. in sod., 2014; Fernandez-Costas C. in sod., 2017; Lindberg L. E. in sod., 2004; Seppänen S. K. in sod., 2004; Vek V. in sod., 2013a). V naših podoktorskih raziskavah smo se odločili za metodo analize glivne inhibicije z direktnim

nanosom testnih fitokemikalij v petrijevko s hranilnim gojiščem (Vek V. in sod., 2020a; Vek V. in sod., 2021b; Vek V. in sod., 2022a). Rezultati difuzijskega testa na hranilnem gojišču so jasno pokazali, da ekstraktivi in polifenoli grč rdečega bora izrazito inhibirajo razvoj testnih gliv razkrojevalk lesa in plesni (slika 13). Pri tem smo ugotovili, da so očiščeni ekstraktivi, torej stil-bena pinosilvin (PS) in pinosilvin monometilni eter (PSMME), značilno bolj inhibirali testne organizme kot surovi in neočiščeni hidrofilni ekstrakti grč bora. Dobre fungicidne lastnosti smo ugotovili predvsem za PSMME, ki je v največji meri inhibiral razvoj nava-dne tramovke (*Gloeophyllum trabeum*) in pahljačice (*Schizophyllum commune*) (slika 13a). Pinosilvini s PS in PSMME so spojine, ki jim literatura pripisuje citoto-ksične lastnosti s katerimi negativno vplivajo na razvoj gliv razkrojevalk lesa (Lindberg L. E. in sod., 2004; Si-mard F. in sod., 2008; Välimaa A.-L. in sod., 2007). Sama molekulska struktura z eno metilno skupino določa PSMME kot delno lipofilno spojino, kar tej molekuli omogoča dobro prehodnost skozi biološke membrane (Plumed-Ferrer C. in sod., 2013) in s tem še boljši inhi-bitorni učinek. O fungicidnih lastnostih in inhibitornih mehanizmih pinosilvinov podrobneje razpravljamo v Vek V. in sod. (2020b).

Ravno nasprotno, rezultati difuzijskega testa niso



Slika 13: Rezultati *in vitro* difuzijskega testa na hranilnem gojišču po končani inkubaciji. Ekstraktivi bora inhibirajo razvoj gliv razkrojevalk lesa in plesni. Inhibicija rasti (a) pahljačice (*Schizophyllum commune* - Sc) in (b) plesni (*Fusarium solani* - Fus) s hidrofilnimi ekstraktivi lesa rdečega bora (*Pinus sylvestris* L.). KWE, hidrofilni ekstrakt grč rdečega bora. PS, pinosilvin. PSMME, pinosilvin monometilni eter. Kontrola, topilo dimetil sulfoksid (DMSO) (Vek V. in sod., 2022a) (foto: V. Vek).

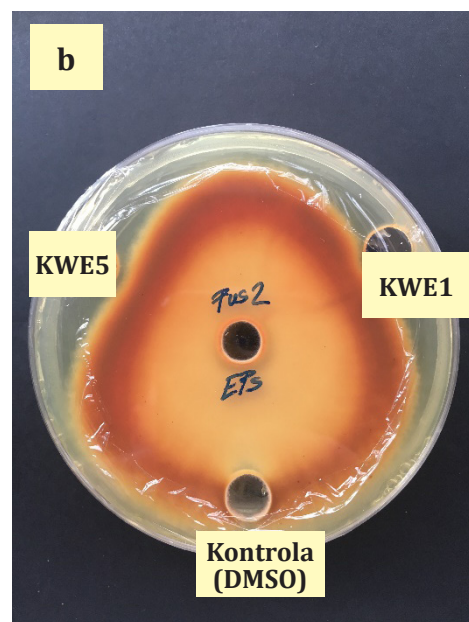


Fig. 13: Results of the *in vitro* well diffusion test after incubation. Extractives from Scots pine inhibit the growth of wood-decaying fungi and molds. Inhibition of (a) *Schizophyllum commune* (Sc) and (b) mold *Fusarium solani* (Fus) by hydrophilic extractives of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). KWE, hydrophilic extract of Scots pine knotwood; PS, pinosylvin; PSMME, pinosylvin monomethyl ether; control, solvent dimethyl sulfoxide (DMSO) (Vek V. et al., 2022a) (photo: V. Vek).

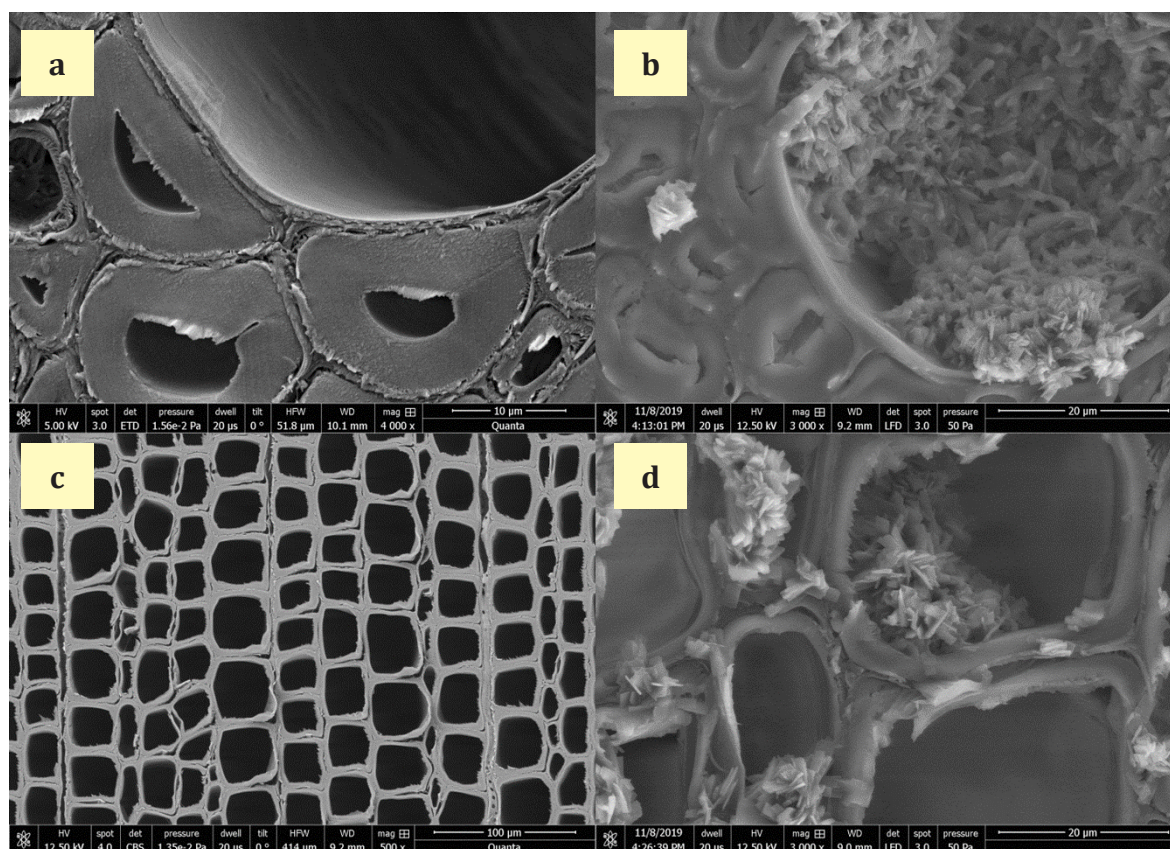
pokazali inhibitornega potenciala ekstraktom robinije in čistim robinetinom (DHR in Rob). Ti rezultati so nekakšno nasprotje tistemu, kar navaja literatura, saj le-ta visoko naravno odpornost jedrovine robinije pojasnjuje z razširjenostjo fenolnih ekstraktivov, ki se v velikih količinah pojavljajo v teh tkivih (Magel E. in sod., 1994; Sablik P. in sod., 2016; Sergent T. in sod., 2014). Z našimi raziskavami smo sicer demonstrirali, da ekstraktivi lesa robinije v določeni meri inhibirajo razvoj micelija bele hišne gobe (*Fibroporia vaillantii*) v *in vitro* razmerah, a je bila ta inhibicija v primerjavi z ekstraktivi grč bora značilno manjša oziroma irelevantna (Vek V. in sod., 2020a).

3.4.2 Učinkovitost impregnacije lesa z ekstraktivi

3.4.2 Effectiveness of wood impregnation with extractives

Vpliv bioaktivnih ekstraktivov lesa na odpornost beljave rdečega bora in bukve proti glivnemu razkroju smo izmerili z mini blok testom, ki je nekoliko spremenjen standardni protokol EN 113 (Humar M. in

sod., 2019; Humar M. in Thaler N., 2017; Zimmer K. in Melcher E., 2017). Pri tem smo biološko manj odporno beljavo bora in bukve impregnirali s hidrofilnimi ekstraktivi grč rdečega bora (KWE) in jedrovine robinije (HWE) po postopku za impregnacijo lesa v vakuumsko tlačni komori. Borove in bukove količke smo uspešno impregnirali s pripravkom z ekstraktivi, kar smo kvantitativno ovrednotili in potrdili z gravimetrično in mikroskopsko metodo (Vek V. in sod., 2020a). Rezultati analiz so pokazali, da nam je s postopkom impregnacije uspelo zadržati ekstraktive grč KWE in jedrovine HWE v lesnem matriksu testnih količkov. Največji delež KWE in HWE smo zadržali v borovini, kar pripisujemo večji poroznosti in longitudinalni permeabilnosti beljave rdečega bora. V lesnih količkih smo zadržali večji delež HWE kot KWE, kar smo pojasnili z večjo polarnostjo spojin v HWE, ki bi lahko bila vzrok za večjo topnost in s tem zadrževanje flavonoidov na hidrofilnem substratu celične stene (Vek V. in sod., 2020a). Nasprotno hidrofilni ekstrakti grč rdečega bora poleg hidrofilnih spojin dokazano vsebujejo tudi manjši delež delno



Slika 14: SEM-mikrografi bukovine (*Fagus sylvatica* L.) in borovine (*Pinus sylvestris* L.), pred in po impregnaciji z ekstraktivi. Mikroskopija prečnih prereзов: neimpregnirana beljava (kontrolni vzorec) (a) bukve in (c) rdečega bora ter z ekstraktivi impregniran les (b) bukve in (d) rdečega bora. Mikrografije smo posneli pri 500× in 3000× povečavah. Podrobni rezultati mikroskopske analize so brezplačno dostopni v Vek V. in sod. (2020a).

Fig. 14: SEM micrographs of beech (*Fagus sylvatica* L.) and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), before and after impregnation with extractives. Cross-sectional microscopy: non-impregnated sapwood (control sample) of (a) beech and (c) Scots pine and extractive-impregnated wood of (b) beech and (d) Scots pine. Micrographs were taken at 500x and 3000x magnification. Detailed results of the microscopic analysis are available in open access publication Vek V. et al. (2020a).

nepolarnih spojin, kot je PSMME (Plumed-Ferrer C. in sod., 2013; Poljanšek I. in sod., 2019).

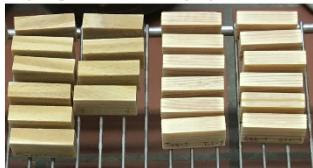
Učinkovitost impregnacijskega postopka smo analizirali tudi s konfokalnim laserskim vrstičnim mikroskopom (CLSM) in elektronskim vrstičnim mikroskopom (SEM). Pri tem smo mikroskopirali orientirane lesene količke, ki smo jih impregnirali z ekstraktivi grč bora (KWE) in jedrovine robinije (HWE). Za kontrolo smo uporabili neimpregnirane vzorce beljave rdečega bora (slika 14c) in bukve (slika 14a). Z mikrografi CLMS in SEM smo potrdili rezultate gravimetrične analize, torej da smo KWE in HWE uspešno vnesli v les in s tem lesene količke ustrezno impregnirali z ekstraktivi, preden smo le-te testirali na odpornost proti glivnemu razkroju. Mikrografi SEM prikazujejo, da so se ekstraktivi z impregnacijo bukovine odložili v lumne traheje (slika 14b), v beljavi rdečega bora so ekstraktivi lepo vidni predvsem kot depoziti v lumnih traheid ranega lesa (slika 14d) ter v lumnih parenhimskih celic (Vek V. in sod., 2020a).

3.4.3 Odpornost lesa, impregniranega z ekstraktivi proti glivnemu razkroju

3.4.3 Resistance of wood impregnated with extracts to fungal decay

Izsledki drugih raziskovalnih skupin jasno kažejo, da protiglivna aktivnost naravnih spojin, izmerjena z *in vitro* testi na hranilnem gojišču, ne more v celoti kazati na vpliv teh spojin na glivni razkroj lesa (Belt T. in sod., 2017; Chen P.-S. in sod., 2014; Hsu F. L. in sod., 2009; Schultz T. P. in sod., 1995; Schultz T. P. in sod., 2004). Torej, če našim ekstraktom ne izmerimo protiglivne aktivnosti na hranilnem gojišču, to še ne pomeni, da te spojine niso sposobne zavirati razkroja lesa. Poleg tega literatura poroča o več načinih impregnacije lesa z bio-osnovanimi pripravki. Manj odporen les so impregnirali z lesnimi ekstrakti bora in robinije v vakuumu (Celimene C. C. in sod., 1999; Sablik P. in sod., 2016; Seppänen S. K. in sod., 2004), z dvofazno impregnacijo z uporabo vakuumu in potapljanjem lesa (Lu J. R. in sod., 2016) ali preprosto s potapljanjem lesa v pripravi (Smith A. L. in sod., 1989). Obstoječi literaturni po-

a Količki beljave bukve in bora, impregnirani s KWE pripravkom



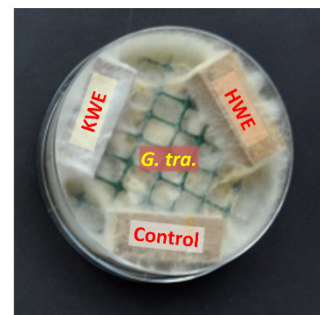
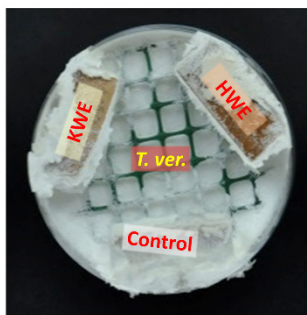
b Količki beljave bukve in bora, impregnirani s HWE pripravkom



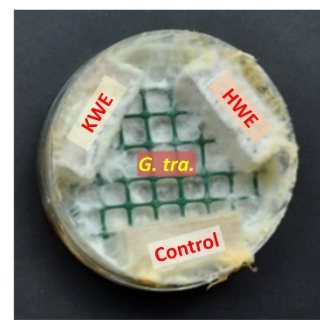
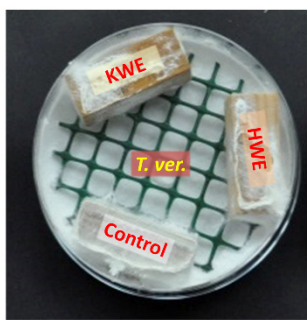
c Kontrolni količki beljave bukve in bora



d Beljava bukve izpostavljena pisani ploskocevk (T. ver.) in navadni tramovki (G. tra.)



e Beljava bora izpostavljena pisani ploskocevk (T. ver.) in navadni tramovki (G. tra.)



Slika 15: Rezultati mini blok testa, s katerim smo analizirali odpornost z ekstraktivi impregniranega lesa proti glivnemu razkroju. Netrajno beljavo rdečega bora (*Pinus sylvestris* L.) in bukve (*Fagus sylvatica* L.) smo impregnirali z (a) ekstraktivi grč bora (KWE) in (b) ekstraktivi jedrovine robinije (HWE), (c) kontrolne in (a, b) impregnirane vzorce smo nato izpostavili (c, d) delovanju gliv bele in rjave trohnobe (Vek V. in sod., 2020a; Vek V. in sod., 2022a) (foto: V. Vek).

Fig. 15: Results of the mini block test used to analyze the resistance of wood impregnated with extracts against fungal decay. Less durable sapwood of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and beech (*Fagus sylvatica* L.) was impregnated with (a) Scots pine knotwood extract (KWE) and (b) black locust heartwood extract (HWE). (c) Control and (a, b) impregnated samples were then exposed to (c, d) white and brown rot fungi (Vek V. et al., 2020a; Vek V. et al., 2022a) (photo: V. Vek).

datki ne vsebujejo jasnih informacij o vplivu ekstraktivov grč rdečega bora in jedrovine robinije na glivni razkroj lesa, pri tem so očitne tudi razlike v uporabljenih eksperimentalnih pristopih in izvedbi samih testov. Z našimi raziskavami smo bioaktivni učinek hidrofilnih ekstraktivov lesa rdečega bora in robinije analizirali z več testi. Poleg *in vitro* protiglivnega učinka ekstraktivov na hranilnem gojišču in antioksidativne kapacitete smo z mini blok testom ocenili tudi vpliv ekstraktivov na razkroj lesa.

Z impregnacijo beljave bora in bukve z ekstraktivi KWE in HWE nam je uspelo znižati izgubo mase zaradi delovanja bele in rjave trohnobe ter s tem povešati odpornost impregniranega lesa proti glivnemu razkroju. Kljub temu, da z *in vitro* difuzijskim testom ekstraktivom robinije HWE nismo pripisali fungistatičnih lastnosti (poglavje 3.3.1), smo z impregnacijo netrajne beljave s HWE značilno povečali odpornost vzorcev na glivni razkroj (Vek V. in sod., 2020b). Naš test je pokazal najboljše rezultate v primeru, ko smo beljavo bora impregnirali s HWE ekstraktivi robinije in impregnirane vzorce izpostavili delovanju glivi rjave trohnobe, torej navadni tramovki (*Gloeophyllum trabeum*) (slika 15). Ugotovili smo, da razkroj lesa inhibirajo tudi ekstraktivi grč bora (KWE), kar se dobro ujema z rezultati difuzijskega testa na hranilnem gojišču. V primerjavi z neimpregnirano borovino so ekstraktivi HWE robinije izgubo mase vzorcev impregniranega lesa zmanjšali za več kot 10-krat, ekstraktivi grč bora pa za skoraj 7-krat (Vek V. in sod., 2020a). Slabše rezultate smo dobili pri impregnaciji bukovine in izpostavitvi impregniranih vzorcev beli trohnobi (slika 15). Ekstraktivi KWE in HWE so v manjši meri sicer povečali odpornost lesa proti razkroju z belo trohnobo, a po končanem testu razlike v izgubi mase med neimpregniranimi/kontrolnimi in impregniranimi vzorci lesa niso bile statistično značilne. Pisano ploskocevkó (*Trametes versicolor*) namreč na splošno opisujemo kot učinkovito razkrojevalko lesa in jo uvrščamo med neselektivne vrste gliv bele trohnobe. Za le-te je značilno, da istočasno razgrajujejo vse strukturne komponente olesenele celične stene (Bari E. in sod., 2021; Lekounougou S. in sod., 2008).

S testiranjem protiglivnih lastnosti smo dokazali, da ekstraktivi grč rdečega bora in jedrovine robinije izkazujejo fungistatične lastnosti in povečujejo odpornost impregniranega lesa proti glivnemu razkroju. *In vitro* difuzijski test na hranilnem gojišču je pokazal, da ekstrakti grč bora izjemno dobro inhibirajo razvoj gliv razkrojevalk lesa in plesni. Stilbeni s pinosilvinom in pinosilvin monometilnim etrom izkazujejo citotoksične lastnosti, kar literatura pojasnjuje s kemijsko struk-

turo stilbenov in manjšo polarnostjo teh spojin, kar omogoča stilbenom dobro inhibicijo glivnega micelija (Plumed-Ferrer C. in sod., 2013). Z našimi *in vitro* difuzijskim testom ekstraktivom jedrovine robinije nismo dokazali inhibitornega učinka na rast gliv razkrojevalk lesa, so se pa ekstraktivi robinije izkazali kot izredno dobri antioksidanti in lovci prostih radikalov. V primerjavi z ekstraktivi grč bora in referenčnimi antioksidanti so ekstraktivi robinije delovali antioksidativno tudi pri nižjih testnih koncentracijah. Rezultati mini blok testa na glivni razkroj je potrdil literaturni podatek, da ekstraktivi jedrovine robinije značilno vplivajo na večjo naravno odpornost lesa in boljšo odpornost lesa proti glivnemu razkroju (Magel E. in sod., 1994; Sablik P. in sod., 2016; Smith A. L. in sod., 1989). Dokazano je, da lahko zaščitno vlogo fenolnih spojin pojasnimo z njihovimi biocidnimi in/ali nebiocidnimi lastnostmi (Schultz T. P. in Nicholas D. D., 2000, 2002). Strukturne komponente s celulozo, hemicelulozami in ligninom so v celični steni olesenele celice urejene tako, da so dimenzije medmolekularnih prostorov premajhne, da bi v celično steno lahko penetrirali relativno veliki ekstracelularni glivni encimi. Zato glive za razkroj lesa poleg encimov producirajo in uporabljajo tudi reaktivne spojine z nizko molekulsko maso. To so reaktivni prosti radikali, ki lahko pred encimskim napadom prodrejo v celično steno lesa in delno depolimerizirajo lignin ter s tem povečajo velikost medmolekularnih por, skozi katere lahko nato v matriks celične stene prodrejo večji glivni encimi (Arantes V. in sod., 2012; Bari E. in sod., 2021; Belt T. in sod., 2017; Goodell B. in sod., 1997; Schmidt O., 2006; Valette N. in sod., 2017). Zaščitni mehanizem, s katerim ekstraktivi robinije inhibirajo glivni razkroj lesa, lahko na osnovi naših rezultatov in literaturnih podatkov pojasnimo z nebiocidnimi efekti, tj. z njihovimi antioksidativnimi lastnostmi in sposobnostjo lovljenja prostih radikalov (Vek V. in sod., 2020a). Ekstraktivi s tem ščitijo les in inhibirajo glivni razkroj v začetnih fazah glivnega razkroja, in sicer z inaktivacijo in redukcijo glivnih prostih radikalov, ki napadajo in depolimerizirajo strukturne komponente celične stene lesa. Največje težave pri nadaljnji komercializaciji biocidnih proizvodov na osnovi rastlinskih ekstraktivov povzročajo zakonodajne ovire. Registracija vseh biocidnih učinkovin, ne glede na izvor (sintetičen ali naraven), je zelo zahtevna in draga. To je razlog, da v zadnjih letih ni bilo registrirane nobene nove aktivne učinkovine za zaščito lesa. Zato bi bilo smiselno, da bi v prihodnje prilagodili registracijo aktivnih učinkovin, ki temeljijo na naravnih spojinah.

4 ZAKLJUČKI

4 CONCLUSIONS

S pregledom rezultatov in dognanj, do katerih smo prišli z dvema podoktorskima projektoma, predstavljamo enega izmed možnih načinov za valorizacijo manjvredne lesne biomase, ki smo jo uporabili kot surovino za pridobivanje naravnih fungistatičnih in antioksidativnih spojin. Izsledki naših raziskav posredno potrjujejo tudi določene segmente koncepta krožnega gospodarstva, saj smo eksperimentalno pokazali, da so lahko odlomljeni deli dreves in lesni ostanki pomemben vir zelenih kemikalij. Ostanke industrij in manj vredno drevesno biomaso lahko obravnavamo kot surovino, ki je osnova za nov produkt, ali pa takšno biomaso enostavno ponudimo na trgu kot pomembno surovino naravnih polifenolov. Veliko povpraševanje po rastlinskih polifenolih z antioksidativnimi, protivnetnimi in protimikrobnimi lastnostmi priča o vse večjem interesu po uporabi teh rastlinskih proizvodov na področju prehranskih dopolnil in nutricevtikov, kozmetike, bio-osnovanih zaščitnih sredstvih itd. Ekstraktivi drevesne biomase se že uporabljajo v komercialno dostopnih produktih. Vendar pa v tej zgodbi še vedno ostaja velik izziv, kako zagotoviti zadostne količine drevesne biomase, primerne za industrijsko ekstrakcijo naravnih polifenolov. Pri tem imajo ključen pomen tudi izbira ustrezne drevesne vrste, ustrezna predpriprava biomase za ekstrakcijo in tudi ustrezni parametri ekstrakcijskega procesa. Vse to je predmet naših tekočih in nadaljnjih raziskav, del rezultatov na to temo smo tudi že delili z javnostjo s področja prehranskih dopolnil (Domazet M. in sod., 2023; Oven P. in sod., 2023; Vek V. in sod., 2024a; Vek V. in sod., 2021c).

5 POVZETEK

5 SUMMARY

The circular economy views production side streams as valuable and independent value chains. Low-value tree biomass, including residues from the wood processing industry and less useful tree species, is considered an important raw material for bio-based products. This biomass includes wood and bark from trees damaged by weather events or bark beetle infestations. Wood and bark, often referred to as biocomposites, consist of cellulose, hemicellulose, and lignin, along with extractives such as phenolic compounds. These phenolic extractives have fungistatic, antimicrobial, and antioxidant properties, making them valuable for bio-based preservatives, pharmaceuticals, and dietary supplements. Wood is a versatile, sustainable material known for its mechanical properties, durability, and aesthetic appeal. It is widely used in construction

and furniture due to its natural beauty and renewable nature. One significant advantage of wood is its biodegradability, which allows it to decompose naturally and reduce environmental impact. However, this trait can also be a drawback, as it may shorten the lifespan of wood products. Impregnation treatments with preservatives can enhance wood's resistance to decay, insects, and moisture, thereby extending its service life. Selecting naturally durable species, using construction-based protection, or using thermal or chemical modification can also limit biodegradability. Conventional chemical preservation usually involves synthetic biocides, which can be harmful to the environment and human health. Replacing these toxic biocides with natural bioactive compounds is a key research goal. This report presents an overview of the most significant findings from two national postdoctoral research projects supported by the Ministry of Education, Science and Sport of the Republic of Slovenia (MIZŠ) and the Slovenian Research and Innovation Agency (ARIS). Our research explored the potential of using bioactive extractives from Scots pine knotwood and black locust heartwood to protect susceptible and non-durable wood species against fungal decay. These extractives were identified as stilbenes and flavonoids.

All the Scots pine trees (*Pinus sylvestris* L.) included in the study were broken and injured, while the black locust trees (*Robinia pseudoacacia* L.) were largely intact, except for one with trunk damage. Black locust notable for its application potential and climate resilience. Several sample disks were taken from each tree, and samples of sapwood, heartwood, wound wood, reaction zone, partially decayed wood, knotwood, and bark were collected. Phenolic extractives were obtained with aqueous acetone using conventional and advanced extraction techniques. The hydrophilic extracts were chemically analyzed for quality and quantity using spectrophotometric and chromatographic methods. For antifungal testing, hydrophilic extracts of Scots pine knotwood (KWE) and black locust heartwood (HWE), along with purified compounds, i.e. pinosylvins (PS), pinosylvins monomethyl ether (PSMME), dihydrorobinetin (DHR), and robinetin (Rob), were prepared. Using an agar well diffusion method, the antifungal properties of Scots pine and black locust extractives against two brown rot fungi (*Gloeophyllum trabeum* and *Fibroporia vaillantii*) and two white rot fungi (*Trametes versicolor* and *Schizophyllum commune*) were investigated. The resistance to fungal decay of impregnated, non-durable wood species was measured *in vitro* using a mini-block test according to a modified EN 113 protocol. Bioinspired preservatives

were prepared as aqueous solutions of KWE and HWE and used to impregnate non-durable wood species. The retention of KWE and HWE was tested gravimetrically and microscopically using confocal laser scanning microscopy (CLSM) and scanning electron microscopy (SEM). Cellulose nanofibrils (CNF) were also included in the study to increase the retention of extractives in the wood matrix. Fungal decay was measured gravimetrically and expressed as mass loss of the decayed wood block. The antioxidant capacity of pine knotwood and black locust heartwood extracts was determined colorimetrically by measuring the free radical scavenging activity of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Extracts were compared with reference antioxidants, including gallic acid (GA), ascorbic acid (AA), and butylhydroxyanisole (BHA).

Chemical analyses showed that knotwood samples contained an average of 7.28% TEC and 3.33% TPC, while black locust heartwood contained 6.18% TEC and 2.48% TPC. HPLC analysis confirmed that wood biomass is a significant source of polyphenols. Pinosylvin (PS) and pinosylvin monomethyl ether (PSMME) were the most abundant polyphenols in knotwood extracts (KWE), while robinetin (Rob) and dihydrorobinetin (DHR) were characteristic of heartwood extracts (HWE). It is noteworthy that even damaged tree parts contained sufficient quantities of phenolic extractives for further use. Purified stilbenes (PS and PSMME) inhibited fungal growth more effectively than crude pine knot extracts, especially against brown rot fungi. Conversely, Rob, DHR, and crude black locust heartwood extracts showed no inhibitory potential. Gravimetric and microscopic analyses showed that KWE and HWE were successfully incorporated into the sapwood matrix of Scots pine and beech and remained there. The weight gain (GW) after impregnation was greater in pine sapwood blocks due to the higher porosity and permeability. The highest GW was measured after impregnation with HWE, which is probably due to the higher polarity and solubility of the compounds. SEM and CLSM results showed that HWE was deposited as crystal-like structures in beech wood and as lumina of the earlywood tracheids and ray parenchyma in pine sapwood. KWE appeared as an opaque layer covering the cell walls. Impregnation with these extractives reduced mass loss after exposure to white rot and brown rot fungi. Black locust extractives reduced fungal decay, with the greatest difference in mass loss observed in pine sapwood exposed to *Gloeophyllum trabeum*. Extractives from Scots pine knotwood and black locust heartwood were less effective against *Trametes versicolor*. Colorimetric analysis showed that black

locust extractives were better free radical scavengers for DPPH than pine knotwood extractives. The antioxidant capacity of HWE was comparable to that of reference antioxidants such as gallic acid and ascorbic acid. At lower concentrations, black locust extractives performed better than ascorbic acid. On the other hand, pine knotwood extractives did not prove to be good scavengers of DPPH free radicals in our study.

Our study demonstrates that natural polyphenols with antifungal and antioxidant properties can be obtained from low-value wood of coniferous and deciduous tree species. The knotwood of Scots pine and the heartwood of black locust contain large amounts of specific polyphenols such as stilbenes and flavonoids. Extractives from these tissues inhibit fungal decay in impregnated wood. The plate assay confirmed strong antifungal activity for Scots pine knot extractives and their stilbene compounds. The protective role of these compounds can be attributed to their biocidal and non-biocidal properties. The antifungal efficacy of stilbenes depends on their chemical structure and polarity. While HWE showed no direct antifungal effects, its strong antioxidant performance suggests a non-biocidal mechanism of protection. The ability to scavenge free radicals is an important factor in limiting fungal decay. Recent research supports the potential of plant polyphenols for use in bio-based preservatives, cosmetics, and dietary supplements due to their antifungal and antioxidant properties.

6 ZAHVALA

6 ACKNOWLEDGEMENTS

Zahvala Ministrstvu za visoko šolstvo, znanost in inovacije Republike Slovenije ter Javni agenciji za raziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS) za podporo podoktorskim projektom 6316-9/2015-142 in ARRS-ZAPOSŁ-MDR 39/2015. Prispevek smo pripravili v okviru raziskovalnih dejavnosti programske skupine P4-0015 (Les in lignocelulozni kompoziti). Avtorji se zahvaljujemo agenciji ARIS in podjetju Ars Pharmae d.o.o. za financiranje projekta L4-2623 (ArsAlbi). Del aktivnosti smo opravili tudi v okviru mednarodnega projekta WoodWisdom Era-Net Pinobio, Urban Innovative Actions projekta Applause (UIA02-228) in M-Era.Net projekta Bapur, ki ga financira Univerza v Ljubljani. Zahvaljujemo se ge. Heleni Zorn in g. Milošu Merviču iz Zavoda za Gozdove Slovenije (Krajevna enota Tolmin) za pomoč pri organizaciji in izvedbi poseka dreves ter sodelavcem s Katedre za lesne škodljivce, zaščito in modifikacijo lesa Oddelka za lesarstvo za vso tehnično pomoč pri opravljanju glivnih testov.

VIRI

REFERENCES

- Arantes V., Jellison J., Goodell B. 2012. Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 2: 323–338.
- Atwi-Ghaddar S., Destandau E., Lesellier E. 2023. Optimization of supercritical fluid extraction of polar flavonoids from *Robinia pseudoacacia* L. heartwood. *Journal of CO2 Utilization*, 70, 102440. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2023.102440>
- Barbero-López A., Akkanen J., Lappalainen R., Peräniemi S., Haapala A. 2021. Bio-based wood preservatives: their efficiency, leaching and ecotoxicity compared to a commercial wood preservative. *Science of the Total Environment*, 753, 142013
- Bari E., Ohno K., Yilgor N., Singh A. P., Morrell J. J. in sod. 2021. Characterizing fungal decay of beech wood: potential for biotechnological applications. *Microorganisms*, 9, 2: 247
- Belt T., Hanninen T., Rautkari L. 2017. Antioxidant activity of Scots pine heartwood and knot extractives and implications for resistance to brown rot. *Holzforschung*, 71, 6: 527–534
- Brus R., Pötzelsberger E., Lapin K., Brundu G., Orazio C. in sod. 2019. Extent, distribution and origin of non-native forest tree species in Europe. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 34, 7: 533–544
- Celimene C. C., Micales J. A., Ferge L., Young R. A. 1999. Efficacy of pinosylvin against white-rot and brown-rot fungi. *Holzforschung*, 53, 5: 491–497
- Chemat F., Rombaut N., Meullemiestre A., Turk M., Perino S. in sod. 2017. Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 41, 357–377
- Chen P.-S., Chen Y.-H., Yeh T.-F., Chang S.-T. 2014. Mechanism of decay resistance of heartwood extracts from *Acacia confusa* against the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. *Wood Science and Technology*, 48, 3: 451–465. <https://doi.org/10.1007/s00226-014-0615-6>
- Cory H., Passarelli S., Szeto J., Tamez M., Mattei J. 2018. The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review. *Frontiers in Nutrition* 5: 87. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>
- D'Andrea G. 2010. Pycnogenol: A blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, 81, 7: 724–736
- Dian-Qing Y. 2009. Potential utilization of plant and fungal extracts for wood protection. *Forest Products Journal*, 59, 4: 97
- Domazet M., Zaloker U., Vek V. 2023. *Ars Pharmae@: innovative natural approach to prevent and reduce diseases of modern times; food supplements from wood extractives. V: BioRural knowledge-exchange workshop: advancing the european rural bioeconomy*. Online, 14–16. 02. 2024
- Dünisch O., Richter H. G., Koch G. 2010. Wood properties of juvenile and mature heartwood in *Robinia pseudoacacia* L. *Wood Science and Technology*, 44, 2: 301–313
- Dyderski M. K., Paž S., Frelich L. E., Jagodziński A. M. 2018. How much does climate change threaten European forest tree species distributions? *Global Change Biology*, 24, 3: 1150–1163
- EN 113 (1997) Wood preservatives - Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes - Determination of the toxic values. British Standards. CEN (European committee for standardization), Brussels.
- Fernandes C., Gaspar M. J., Pires J., Alves A., Simoes R. in sod. 2017. Physical, chemical and mechanical properties of *Pinus sylvestris* wood at five sites in Portugal. *Iforest-Biogeoosciences and Forestry*, 10, 669–679
- Fernandez-Costas C., Palanti S., Charpentier J. P., Sanroman M. A., Moldes D. 2017. A Sustainable treatment for wood preservation: enzymatic grafting of wood extractives. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5, 9: 7557–7567
- Freeman M. H., McIntyre C. R. 2008. A comprehensive review of copper-based wood preservatives. *Forest Products Journal*, 58, 11: 6–27
- Goodell B., Jellison J., Liu J., Daniel G., Paszczynski A. in sod. 1997. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. *Journal of Biotechnology*, 53, 2: 133–162. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00714>
- Harju A. M., Venäläinen M. 2006. Measuring the decay resistance of Scots pine heartwood indirectly by the Folin-Ciocalteu assay. *Canadian Journal of Forest Research*, 36, 7: 1797–1804
- Hill C. A. S. 2011. Wood modification: An update. *Bioresources*, 6, 2: 918–919
- Hofmann T., Nebehaj E., Albert L. 2015a. The high-performance liquid chromatography/multistage electrospray mass spectrometric investigation and extraction optimization of beech (*Fagus sylvatica* L.) bark polyphenols. *Journal of Chromatography A*, 1393: 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.030>
- Hofmann T., Nebehaj E., Stefanovits-Bányai É., Albert L. 2015b. Antioxidant capacity and total phenol content of beech (*Fagus sylvatica* L.) bark extracts. *Industrial Crops and Products*, 77, 375–381
- Holmbom B. 2011. Extraction and utilisation of non-structural wood and bark components. V: Biorefining of forest resources. Alén R. (ur.). (Biorefining of forest resources, book 20). Helsinki, Paper Engineers' Association/Paperi ja Puu Oy: 178–224
- Hosseinhashemi S. K., HosseinAshrafi S. K., Goldeh A. J., Salem M. Z. M. 2016. Antifungal and antioxidant activities of heartwood, bark, and leaf extracts of *Robinia pseudoacacia*. *Bioresources*, 11, 1: 1634–1646
- Hsu F. L., Chen P. S., Chang H. T., Chang S. T. 2009. Effects of alkyl chain length of gallates on their antifungal property and potency as an environmentally benign preservative against wood-decay fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 5: 543–547
- Humar M., Kržišnik D., Lesar B., Brischke C. 2019. The Performance of Wood Decking after Five Years of Exposure: Verification of the Combined Effect of Wetting Ability and Durability. *Forests*, 10, 10: 903. <https://doi.org/10.3390/f10100903>
- Humar M., Lesar B. 2008. Fungicidal properties of individual components of copper-ethanolamine-based wood preservatives. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62, 1: 46–50
- Humar M., Pohleven F. 2007. Experiences with non-standard test methods for estimation of fungicidal properties and mode of fungicidal action (Experiențe în utilizarea unor metode de testare nestandardizate de evaluare a proprietăților fungicidelor și a modului lor de acțiune). *Pro Ligno*, 3, 3: 17–25
- Humar M., Thaler N. 2017. Performance of copper treated utility poles and posts used in service for several years. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 116, 219–226
- Humar M., Vek V., Oven P., Lesar B., Kržišnik D. in sod. 2022. Durability and Moisture Dynamics of Douglas-Fir Wood From Slovenia. *Frontiers in Plant Science*, 13: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.860734>
- Jaime L., Batllori E., Lloret F. 2024. Bark beetle outbreaks in coniferous forests: a review of climate change effects. *European Journal of Forest Research*, 143, 1: 1–17
- Kirker G. T., Hassan B., Mankowski M. E., Eller F. J. 2024. Critical review on the use of extractives of naturally durable woods as natural wood protectants. *Insects*, 15, 1: 69. <https://doi.org/10.3390/insects15010069>

- Lekounougou S., Mounguengui S., Dumarçay S., Rose C., Courty P. E. in sod. 2008. Initial stages of *Fagus sylvatica* wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: Enzymatic characterization. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61, 4: 287–293
- Lindberg L. E., Willför S. M., Holmbom B. R. 2004. Antibacterial effects of knotwood extractives on paper mill bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31, 3: 137–147. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0132-y>
- Lu J. R., Venalainen M., Julkunen-Tiitto R., Harju A. M. 2016. Stilbene impregnation retards brown-rot decay of Scots pine sapwood. *Holzforschung*, 70, 3: 261–266. <https://doi.org/10.1515/hf-2014-0251>
- Luque de Castro M. D., Priego-Capote F. 2010. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217, 16: 2383–2389
- Magel E., Jayallemand C., Ziegler H. 1994. Formation of heartwood substances in the stemwood of *Robinia pseudoacacia* L. II. Distribution of nonstructural carbohydrates and wood extractives across the trunk. *Trees-Structure and Function*, 8, 4: 165–171
- Makkar H. 2003. Quantification of tannins in tree and shrub foliage—a laboratory manual. Sordrecht, Kluwer Academic Publishers: str. 43–54.
- Meullemiestre A., Breil C., Abert-Vian M., Chemat F. 2016. Microwave, ultrasound, thermal treatments, and bead milling as intensification techniques for extraction of lipids from oleaginous *Yarrowia lipolytica* yeast for a biojetfuel application. *Bioresource Technology*, 211, 190–199
- Miebach F. 2018. Design ideas for solid timber bridges. *Wood Material Science & Engineering*, 13, 3: 184–189
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211–219
- Nagel T. A., Firm D., Rozenbergar D., Kobal M. 2016. Patterns and drivers of ice storm damage in temperate forests of Central Europe. *European Journal of Forest Research*, 135, 3: 519–530
- Oleson K. R., Schwartz D. T. 2016. Extractives in Douglas-fir forestry residue and considerations for biofuel production. *Phytochemistry Reviews*, 15, 5: 985–1008
- Osolnik U., Vek V., Korošec R. C., Oven P., Poljanšek I. 2024. Integration of wood-based components – Cellulose nanofibrils and tannic acid - into a poly(vinyl alcohol) matrix to improve functional properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 256, 128495
- Oven P., Poljanšek I., Vek V. 2023. Structure and technological properties of biomass side streams : forestry & wood processing. V: *BioRural knowledge-exchange workshop: advancing the european rural bioeconomy*. Online, 14.–16. 02. 2024
- Oven P., Torelli N., Shortle W. C., Zupancic M. 1999. The formation of a ligno-suberized layer and necrophylactic periderm in beech bark (*Fagus sylvatica* L.). *Flora*, 194, 2: 137–144
- Pietarinen S., Willför S., Ahotupa M., Hemming J., Holmbom B. 2006. Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials. *Journal of Wood Science*, 52, 5: 436–444. <https://doi.org/10.1007/s10086-005-0780-1>
- Pitman A. 2017. Deterioration and protection of sustainable biomaterials. *International Wood Products Journal*, 8, 1: 56–56
- Plumed-Ferrer C., Väkeväinen K., Komulainen H., Rautiainen M., Smeds A. in sod. 2013. The antimicrobial effects of wood-associated polyphenols on food pathogens and spoilage organisms (vol 164, pg 99, 2013). *International Journal of Food Microbiology*, 166, 1: 163–163
- Poljanšek I., Oven P., Vek V., Raitanen J. E., Hemming J. in sod. 2019. Isolation of pure pinosylvins from industrial knotwood residue with non-chlorinated solvents. *Holzforschung*, 73, 5: 475–484. <https://doi.org/10.1515/hf-2018-0152>
- Poljanšek I., Oven P., Vek V., Willför S., Raitanen J. E. 2015. Extraction and isolation of pinosylvins from pine wood residue. V: 21st International Symposium on Separation Sciences, Ljubljana, Slovenia, 30. 06.–03. 07. 2015. (Neobjavljeno).
- Rademacher P., Rousek R., Fodor F., Baar J., Koch G. in sod. 2016. Robinia Wood Research – new innovations for a traditional material. V: *Proceedings of the Heradwood conference “Eco-efficient resource wood with special focus on hardwoods” in conjunction with the “Conference of Climate protection through forestry, renewable materials, smart technologies and environmental education” and with the “COST Action FP1407 Workshop”*, Sopron, 08.–09. 09. 2016.
- Ragauskas A. J., Williams C. K., Davison B. H., Britovsek G., Cairney J. in sod. 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 311, 5760: 484–489
- Reinprecht L., Zubkova G., Marchal R. 2010. Decay resistance of laminated veneer lumbers from black locust wood *Wood Research*, 55, 2: 39–52
- Sablik P., Giagli K., Paril P., Baar J., Rademacher P. 2016. Impact of extractive chemical compounds from durable wood species on fungal decay after impregnation of nondurable wood species. *European Journal of Wood and Wood Products*, 74, 2: 231–236
- Schmidt O. 2006. Wood and tree fungi. Biology, damage, protection, and use. (ur.) Berlin, Springer.
- Schultz T. P., Harms W. B., Fisher T. H., McMurtrey K. D., Minn J. in sod. 1995. Durability of angiosperm heartwood: The importance of extractives. *Holzforschung*, 49, 1: 29–34
- Schultz T. P., Nicholas D. D. 2000. Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. *Phytochemistry*, 54, 1: 47–52
- Schultz T. P., Nicholas D. D. 2002. Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. *Phytochemistry*, 61, 5: 555–560
- Seppänen S. K., Syrjälä L., von Weissenberg K., Teeri T. H., Paaanen L. in sod. 2004. Antifungal activity of stilbenes in *in vitro* bioassays and in transgenic *Populus* expressing a gene encoding pinosylvin synthase. *Plant Cell Reports*, 22, 8: 584–593. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0728-0>
- Sergent T., Kohnen S., Jourez B., Beauve C., Schneider Y. J. in sod. 2014. Characterization of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) heartwood extractives: identification of resveratrol and piceatannol. *Wood Science and Technology*, 48, 5: 1005–1017
- Shalaby E. A., Shanab S. M. M. 2013. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7, 10: 528–539
- Simard F., Legault J., Lavoie S., Mshvildadze V., Pichette A. 2008. Isolation and identification of cytotoxic compounds from the wood of *Pinus resinosa*. *Phytotherapy Research*, 22, 7: 919–922. <https://doi.org/10.1002/ptr.2416>
- Singh T., Singh A. P. 2012. A review on natural products as wood protectant. *Wood Science and Technology*, 46, 5: 851–870
- Singleton V. L., Rossi J. A., Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of enology and viticulture*, 16, 3: 144–158
- Smith A. L., Campbell C. L., Walker D. B., Hanover J. W. 1989. Extracts from black locust as wood preservatives: Extraction of decay resistance from black locust heartwood. *Holzforschung*, 43, 5: 293–296
- Tamantini S. 2023. Lignocellulosic feedstock by short supply chain: characterization, new value chain and possible innovations in coating industry: PhD Thesis. Viterbo (VT), University of Tuscia (UNITUS). <http://hdl.handle.net/2067/53166>
- Tamantini S., Del Lungo A., Romagnoli M., Paletto A., Keller M. in sod. 2021. Basic Steps to Promote Biorefinery Value Chains in Forestry in Italy. *Sustainability*, 13, 21, 11731

- Tavčar Benković E., Grohar T., Žigon D., Švajger U., Janeš D. in sod. 2014. Chemical composition of the silver fir (*Abies alba*) bark extract Abigenol® and its antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 52: 23–28
- Tilley A., McHenry M. P., McHenry J. A., Solah V., Bayliss K. 2023. Enzymatic browning: The role of substrates in polyphenol oxidase mediated browning. *Current Research in Food Science*, 7, 100623
- Valette N., Perrot T., Sormani R., Gelhaye E., Morel-Rouhier M. 2017. Antifungal activities of wood extractives. *Fungal Biology Reviews*, 31: 113–123.
- Välimaa A.-L., Honkalampi-Hämäläinen U., Pietarinen S., Willför S., Holmbom B. in sod. 2007. Antimicrobial and cytotoxic knotwood extracts and related pure compounds and their effects on food-associated microorganisms. *International journal of food microbiology* 115, 2: 235–243
- Vek V., Balzano A., Poljanšek I., Humar M., Oven P. 2020a. Improving Fungal Decay Resistance of Less Durable Sapwood by Impregnation with Scots Pine Knotwood and Black Locust Heartwood Hydrophilic Extractives with Antifungal or Antioxidant Properties. *Forests*, 11, 9: 23
- Vek V., Hofmann T., Rajczi E. V., Osolnik U., Poljanšek I. in sod. 2024a. Effect of accelerated extraction and sonication on the antioxidant capacity of wood and bark extracts of wet-hearted silver fir (*Abies alba* Mill.). *European Journal of Wood and Wood Products*, 82, 5: 1479–1490. <https://doi.org/10.1007/s00107-024-02102-1>
- Vek V., Keržič E., Poljanšek I., Eklund P., Humar M. in sod. 2021a. Wood Extractives of Silver Fir and Their Antioxidant and Antifungal Properties. *Molecules*, 26, 21: 6412
- Vek V., Oven P. 2011. Vpliv različnih polarnih topil na delež celokupnih fenolov v lesnih ekstraktih (Influence of different polar solvents on contents of total phenols in wood extracts). *Les wood*, 63, 3: 45–48
- Vek V., Oven P., Humar M. 2013a. Phenolic extractives of wound-associated wood of beech and their fungicidal effect. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 77, 0: 91–97
- Vek V., Oven P., Poljanšek I. 2013b. Content of total phenols in red heart and wound-associated wood in beech (*Fagus sylvatica* L.). *Drvna industrija*, 64, 1: 25–32
- Vek V., Oven P., Ters T., Poljanšek I., Hinterstoisser B. 2014. Extractives of mechanically wounded wood and knots in beech. *Holzfor-schung*, 68, 5: 529–539
- Vek V., Poljanšek I., Balzano A., Humar M., Oven P. 2021b. Extraction of fungitoxic compounds from low-quality wood biomass. V: *Book of abstracts: 4th international conference on technologies & business models for circular economy (TBMCE 2021)*, Portorož, Slovenia, 13.–15. 09. 2021.
- Vek V., Poljanšek I., Balzano A., Oven P., Humar M. 2022a. Impregnation of wood with antifungal compounds from low-quality tree biomass. V: *IRG53 Scientific Conference on Wood Protection*, Bled, 29. 05.–02. 06. 2022.
- Vek V., Poljanšek I., Cerc Korošec R., Humar M., Oven P. 2022b. Impact of steam-sterilization and oven drying on the thermal stability of phenolic extractives from pine and black locust wood. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 1–11. <https://doi.org/10.1080/002773813.2022.2123520>
- Vek V., Poljanšek I., Humar M., Willför S., Oven P. 2020b. In vitro inhibition of extractives from knotwood of Scots pine (*Pinus sylvestris*) and black pine (*Pinus nigra*) on growth of *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor*, *Gloeophyllum trabeum* and *Fibroporia vaillantii*. *Wood Science and Technology*, 54, 6: 1645–1662
- Vek V., Poljanšek I., Osolnik U., Balzano A., Humar M. in sod. 2024b. Low-value wood from non-native tree species as a potential source of bioactive extractives for bio-based preservation. V: 11th hardwood conference proceedings, Sopron, Hungary, 30.–31. 05. 2024.
- Vek V., Poljanšek I., Osolnik U., Oven P. 2024c. Analysis of Extractives in Liquid and Headspace Samples of Silver Fir Using Gas Chromatography Coupled with a Mass Selective Detector. The manuscript of DRVIND.0193 has been accepted for publication in the journal *Drvna industrija*.
- Vek V., Poljanšek I., Oven P. 2019a. Efficiency of three conventional methods for extraction of dihydrorobinetin and robinetin from wood of black locust. *European Journal of Wood and Wood Products*, 77, 5: 891–901
- Vek V., Poljanšek I., Oven P. 2020c. Variability in content of hydrophilic extractives and individual phenolic compounds in black locust stem. *European Journal of Wood and Wood Products*, 78, 501–511
- Vek V., Poljanšek I., Oven P. 2021c. Vpliv skladiščenja in staranja na ekstraktive jelove skorje. V: *Posvet "Kaj vemo o ekstraktivih jelove skorje?"* Podjetniški inkubator Kočevje, 24. 09. 2021. (Neobjavljeno).
- Vek V., Poljanšek I., Oven P. 2022c. Analiza Samtech ekstraktov. V: *Posvet o pilotni ekstrakciji jelove skorje*. Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Ljubljana. 22. 11. 2022. (Neobjavljeno).
- Vek V., Vivod B., Poljanšek I., Oven P. 2019b. Vsebnost ekstraktivov v skorji in lesu robinije (*Robinia pseudoacacia* L.)=Content of extractives in bark and wood of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Acta Silvae et Ligni*, 119, 13 –25. <https://doi.org/10.20315/ASetL.119.2>
- Verkasalo E., Leppälä J., Muhonen T., Korpinen R., Möttönen V. in sod. 2019. Novel industrial ecosystems and value chains to utilize side-streams of wood products industries – Finnish approach. *Pro Ligno Journal*, 15, 4: 157–165
- Vítková M., Müllerová J., Sádlo J., Pergl J., Pyšek P. 2017. Black locust (*Robinia pseudoacacia*) beloved and despised: A story of an invasive tree in Central Europe. *Forest Ecology and Management*, 384, 287–302
- Wang Y., Gao Y., Ding H., Liu S., Han X. in sod. 2017. Subcritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 218, 152–158
- Willför S., Hemming J., Reunanen M., Holmbom B. 2003. Phenolic and lipophilic extractives in Scots pine knots and stemwood. *Holzfor-schung*, 57, 4: 359–372
- Willför S. M., Ahotupa M. O., Hemming J. E., Reunanen M. H. T., Eklund P. C. in sod. 2003. Antioxidant activity of knotwood extractives and phenolic compounds of selected tree species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 26: 7600–7606. <https://doi.org/10.1021/jf030445h>
- Willför S. M., Smeds A. I., Holmbom B. R. 2006. Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography A*, 1112, 1–2: 64–77
- Zimmer K., Melcher E. 2017. A screening study on extractive content and composition of Scots pine heartwood of three stands with close proximity and their resistance against basidiomycetes. *International Wood Products Journal*, 8, 1: 45–49. <https://doi.org/10.1080/20426445.2016.1271091>

