

Е. А. Попова, А. В. Пунгин, А. П. Пантюхина

## ПОВЫШЕНИЕ БИОСИНТЕЗА ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУРАХ *HYSSOPUS OFFICINALIS* L.

Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

Поступила в редакцию 25.05.2024 г.

Принята к публикации 17.06.2024 г.

doi: 10.5922/vestniknat-2024-3-8

102

**Для цитирования:** Попова Е. А., Пунгин А. В., Пантюхина А. П. Повышение биосинтеза вторичных метаболитов в каллусных культурах *Hyssopus officinalis* L. // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Сер.: Естественные и медицинские науки. 2024. № 3. С. 102–126. doi: 10.5922/vestniknat-2024-3-8.

В настоящее время каллусные культуры лекарственных растений активно используются для получения важных биологически активных веществ. Исследование условий, повышающих биосинтез данных соединений в каллусных культурах, является весьма актуальным. В статье изучается влияние различных концентраций фенилаланина и тирозина (1 – 500 мкМ) на содержание фенольных соединений и антиоксидантную активность трех каллусных культур *Hyssopus officinalis* L. Было установлено, что добавление в питательные среды фенилаланина в концентрации 10 мкМ и тирозина в концентрации 100 мкМ приводит к повышению содержания фенольных соединений и гидроксикоричных кислот в каллусных культурах. Повышение антиоксидантной активности экстрактов исследуемых каллусных культур было зафиксировано при концентрациях 10 и 100 мкМ фенилаланина, а также при концентрациях 1, 10 и 100 мкМ тирозина в питательных средах.

**Ключевые слова:** лекарственное растение, каллусная культура, рост, биологически активные вещества, аминокислоты

### Введение

Иссоп лекарственный (*Hyssopus officinalis* L.) является одним из важных лекарственных растений, входящих в семейство яснотковые (Lamiaceae Lindl.). Исследования химического состава *H. officinalis* [1–5] показали, что в данном растении содержатся ценные биологически активные вещества для фармакологического применения. Основные составляющие надземных частей *H. officinalis* – эфирные масла, полифенолы, включая флавоноиды лютеолин, диосмин, кверцетин, апигенин и их глюкозиды, кислоты (хлорогеновая, пара-гидроксibenзойная, протокатехиновая, феруловая, сиринговая, ванилиновая, пара-кумариновая, розмариновая и кофейная), полисахариды, дубильные вещества, пигменты и смолы



[4; 5]. Эти соединения обладают антиоксидантным, противосудорожным, противогрибковым, противомикробным, антигемолитическим, противоязвенным и спазмолитическим свойствами [5–7]. Кроме того, важный компонент *H. officinalis* — розмариновая кислота, содержание которой может достигать  $169,2 \pm 0,6$  мг на 100 г [8]. Исследования показали, что розмариновая кислота проявляет высокую антиоксидантную активность [9; 10]. Также она обладает антибактериальным, противоаллергическим, антиканцерогенным и анти-ВИЧ-1 действием. Благодаря этому розмариновая кислота активно используется в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности [9; 11].

Таким образом, в связи с накоплением в *H. officinalis* большого количества ценных биологически активных веществ, обладающих фармакологической активностью, это растение является перспективным для получения необходимых для медицины и фармацевтики соединений. В настоящее время известно, что каллусные культуры представляет собой более быстрый и надежный способ для получения важных биологически активных веществ по сравнению со сбором растений из природы. Большие преимущества получения каллусной культуры связаны с возможностью ее использования в промышленном производстве путем преобразования в систему суспензионных культур [12].

Каллусные культуры достаточно активно изучают с целью получения из них конкретных терапевтических соединений, таких как паликсантел [13], камптотекин [14] и др. [15–17]. Благодаря отсутствию влияния факторов окружающей среды каллусные культуры в некоторых случаях могут обеспечить выход вторичных метаболитов в более высоких количествах [18]. Синтез биологически активных веществ в культурах тканей растений, в том числе в каллусных культурах, усиливается за счет подбора оптимального состава среды, температуры и регуляторов роста. Например, было установлено, что каллусная культура *H. officinalis*, культивируемая на среде Мурасиге — Скуга, дополненная 2 мг/л кинетина в сочетании с 3 мг/л нафтилуксусной кислоты приводила к наибольшему выходу вторичных метаболитов, в частности флавоноидов и полифенольных соединений, а также к повышению антиоксидантной активности экстрактов [19].

Кроме того, эффективными подходами к усилению биотехнологического производства вторичных метаболитов является использование элиситоров. Научные исследования подтвердили, что растения вырабатывают фитогормоны, такие как салициловая кислота и метилжасмонат, в ответ на стресс или атаку патогенов. Эти вещества считаются сигнальными соединениями, стимулирующими синтез вторичных метаболитов, включая флавоноиды, алкалоиды, терпеноиды и фенилпропаноиды [20].

Другая стратегия заключается в добавлении предшественников вторичных метаболитов для повышения биосинтеза нужных соединений. Сообщалось, что добавление в питательную среду аминокислот фенилаланина и тирозина увеличивало биомассу каллуса *Lobelia inflata* L. в 2–3 раза, а также повышало содержание биологически активных веществ [21].



Таким образом, целью настоящего исследования стала оценка влияния различных концентраций фенилаланина, тирозина на рост и биосинтез вторичных метаболитов в каллусных культурах *H. officinalis*.

### Материалы и методы исследования

Растительный материал. Каллус был получен с использованием асептических проростков *H. officinalis*, полученных из семян (сорт «Леккарь», ГК «Гавриш»), которые культивировались на среде Мурасиге – Скуга (МС) [22] без регуляторов роста с добавлением 7 г/л агара и 30 г/л сахарозы, рН питательной среды 5,6–5,8. Для индукции каллусогенеза листовые экспланты помещали в чашки Петри на три модификации питательной среды МС: МС-2 – с добавлением 2 мг/л кинетина (КИН) и 3 мг/л 1-нафталинуксусной кислоты (НУК); МС-5 – с добавлением 0,8 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) в сочетании с 1,5 мг/л 3-индолилуксусной кислоты (ИУК) и 0,5 мг/л индолил-3-масляной кислоты (ИМК); МС-6 – с добавлением 0,2 мг/л БАП и 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиксусная кислота (2,4-Д). Культивирование проводили в темноте, в условиях термостата при 25 °С в течение 4 недель. Субкультивирование на свежую питательную среду осуществлялось каждые 4 недели.

*Оценка влияния аминокислот на рост каллусной культуры.* Для проведения эксперимента в условиях ламинар-бокса отбирали 0,3 г каллусной культуры и помещали в чашки Петри на три модификации среды МС (МС-2; МС-5; МС-6). Фенилаланин, тирозин в конечных концентрациях 0, 1, 10, 100 и 500 мкМ добавляли в питательные среды. Каллусные культуры культивировали в условиях термостата при 25 °С в течение 30 дней. По истечении данного времени взвешивали сырую биомассу. После растительный материал сушили в термостате при 60 °С в течение 48 ч, а затем взвешивали сухую биомассу. Высушенный материал хранили в морозилке при –18 °С.

*Получение экстрактов.* В фарфоровой ступке растирали 0,1 г сухой биомассы каллусной культуры и количественно переносили в центрифужную пробирку на 15 мл и добавляли 10 мл 70 %-ного этанола. Мацерацию проводили в течение суток на орбитальном шейкере (100 об./мин). После пробирки центрифугировали в течение 20 мин при 3900 g на центрифуге Eppendorf 5810R. Далее супернатант переливали в мерную пробирку на 10 мл и доводили объем 70 %-ным этанолом до метки.

*Суммарное содержание фенольных соединений (СФС).* Определение общего содержания фенольных соединений проводилось с использованием реактива Фолина – Чокальтеу [23]. Для этого в каждую лунку микропланшета добавляли по 100 мкл реактива Фолина – Чокальтеу и по 20 мкл экстракта или стандарта. Смесь перемешивали на орбитальном шейкере (BioSan MPS-1) и выдерживали 4 мин, а затем добавляли 75 мкл 7,5 %-ного раствора карбоната натрия. Смесь инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин, затем регистрировали оптическое поглощение при длине волны 765 нм с помощью микропланшет-ридера (BMG Labtech CLARIOstar). В качестве стандарта использовали галловую кислоту (ГК). Суммарное содержание фено-



нольных соединений оценивали по калибровочной кривой и выражали в мг эквивалентов галловой кислоты на г сухой массы (СМ) каллуса (мг-экв. ГК/г СМ).

*Определение общего содержания гидроксикоричных кислот (СГК).* Суммарное содержание гидроксикоричных кислот оценивали с использованием реактива Арно [24; 25]. К 20 мкл экстракта в лунку микропланшета добавляли 40 мкл 0,5 М HCl, 40 мкл реактива Арно, 40 мкл NaOH и 60 мкл дистиллированной воды. Для каждого экстракта готовился раствор сравнения без добавления реактива Арно. Оптическое поглощение регистрировали при длине волны 525 нм с помощью микропланшет-ридера (BMG Labtech CLARIOstar). В качестве стандарта использовали розмариновую кислоту (РК). Суммарное содержание гидроксикоричных кислот выражали в мг эквивалентов розмариновой кислоты (РК) на г сухой массы (СМ) каллуса (мг-экв. РК/г сухого веса).

*Определение антиоксидантной активности (АОА).* Антиоксидантную активность определяли по способности захватывать радикалы 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH) и 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолино-6-сульфоной кислоты (ABTS), а также по восстановительной способности при взаимодействии с Fe(III)-2,4,6-трипиридил-*s*-триазиновым комплексом (FRAP) [26]. Для построения калибровочного графика использовалась аскорбиновая кислота (АК). Антиоксидантную активность выражали в мг эквивалентов аскорбиновой кислоты на г сухой массы (СМ) каллуса (мг-экв. АК/г СМ). При определении антиоксидантной активности методом DPPH в луночном микропланшете 20 мкл экстракта смешивали с 300 мкл 0,1 мМ раствора DPPH. В качестве раствора сравнения использовали 300 мкл DPPH и 20 мкл 70 %-ного раствора этанола. Смесь инкубировали 60 мин в темноте при комнатной температуре. Снижение оптического поглощения было зафиксировано при 515 нм. При определении антиоксидантной активности методом ABTS в каждой лунке микропланшета 20 мкл экстракта смешивали с 300 мкл приготовленного раствора катион-радикала ABTS. Полученную смесь инкубировали 15 мин в темноте, оптическое поглощение измеряли при длине волны 734 нм. Для определения восстановительной способности экстрактов использовали реагент FRAP. Для проведения реакции к 20 мкл исследуемого экстракта в лунку микропланшета добавляли по 300 мкл реагента FRAP. Полученную смесь инкубировали 10 мин, затем измеряли оптическое поглощение при длине волны 593 нм. Все измерения оптического поглощения проводили с помощью микропланшет-ридера (BMG Labtech CLARIOstar).

*Статистический анализ.* Статистическая обработка полученных экспериментальных данных проводилась с использованием программы IBM SPSS Statistics 23. Для проверки на нормальность распределения выборок использовали критерий Шапиро – Уилка. Для сравнения средних значений в выборках и оценки значимости различий применяли параметрический однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки ( $p=0,05$ ) и непараметрический критерий Краскала – Уоллиса. Корреляционный анализ проводился с использованием коэффициента корреляции Пирсона.

## Результаты и обсуждение

## Влияние различных концентраций аминокислот на рост каллусной культуры

Ранее сообщалось, что высокие концентрации фенилаланина и тирозина в значительной степени предотвращают рост клеток. В свою очередь, небольшие концентрации фенилаланина и тирозина значительно увеличивают как сырую, так и сухую биомассу растений [27].

Как мы видим на рисунке 1, *a*, наибольший прирост сырой биомассы ( $2,88 \pm 1,39$  г) каллусной культуры, выращенной на среде МС-2, наблюдался при добавлении 10 мкМ фенилаланина в питательную среду. Для сухой биомассы добавление фенилаланина приводило к уменьшению прироста (рис. 2, *a*). Наименьший прирост сырой ( $1,43 \pm 0,79$  г) и сухой ( $0,07 \pm 0,03$  г) биомассы был зафиксирован при внесении 100 мкМ фенилаланина в данную питательную среду.

106

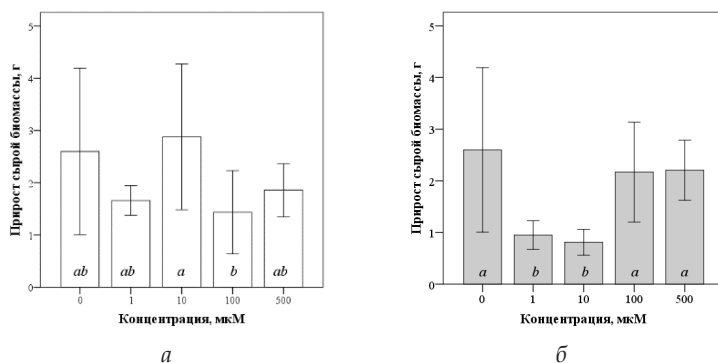


Рис. 1. Прирост сырой биомассы каллусной культуры *H. officinalis*, выращенной на среде МС-2 с добавлением фенилаланина (*a*) и тирозина (*б*).

Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )

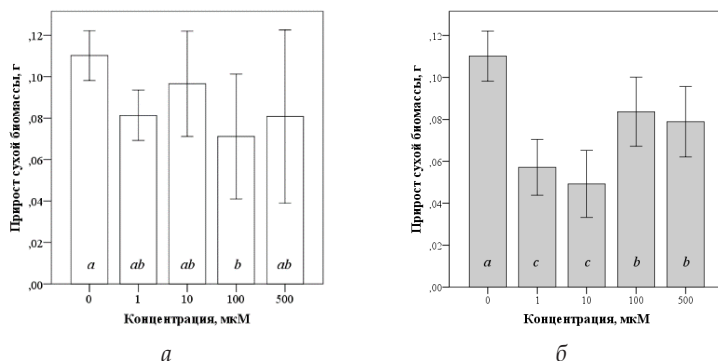


Рис. 2. Прирост сухой биомассы каллусной культуры *H. officinalis*, выращенной на среде МС-2 с добавлением фенилаланина (*a*) и тирозина (*б*).

Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )



Высокий прирост сырой биомассы культуры МС-2 наблюдался при внесении тирозина в концентрации 100 ( $2,16 \pm 0,96$  г) и 500 мкМ ( $2,20 \pm 0,58$  г), а также без его добавления ( $2,60 \pm 1,59$  г) (рис. 1, б). Наибольший прирост сухой биомассы отмечен на среде без добавления тирозина (рис. 2, б). Таким образом, присутствие тирозина в питательной среде МС-2 не показало статистически значимых эффектов на повышение сырой и сухой биомассы каллусной культуры.

Высокий прирост сырой (рис. 3, а) и сухой (рис. 4, а) биомассы для каллусной культуры, выращенной на среде MS-5, наблюдался без добавления фенилаланина (0 мкМ). Прирост сырой биомассы каллуса составил  $2,21 \pm 0,53$  г, а сухой —  $0,09 \pm 0,02$  г. В то же время с увеличением концентрации фенилаланина в питательной среде прирост сырой и сухой биомассы статистически значимо не изменялся, но был ниже в 5 раз по сравнению с контролем (0 мкМ).

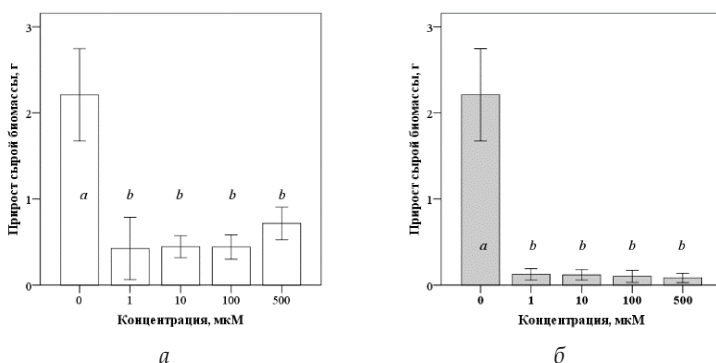


Рис. 3. Прирост сырой биомассы каллусной культуры *H. officinalis*, выращенной на среде МС-5 с добавлением фенилаланина (а) и тирозина (б).

Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )

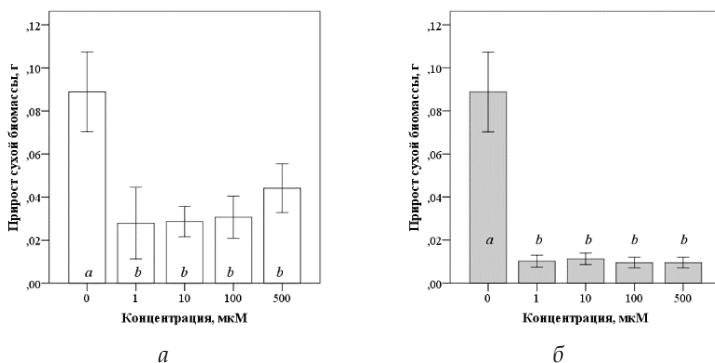


Рис. 4. Прирост сухой биомассы каллусной культуры *H. officinalis*, выращенной на среде МС-5 с добавлением фенилаланина (а) и тирозина (б).

Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )

Добавление разных концентраций тирозина в питательную среду МС-5 приводило к снижению прироста сырой и сухой биомассы каллусной культуры по сравнению с контролем (рис. 3, б). Таким образом, присутствие тирозина и фенилаланина в питательной среде МС-5 не показало статистически значимых различий на повышение сырой и сухой биомассы каллусной культуры.

Добавление разных концентраций фенилаланина в питательную среду МС-6 не показало статистически значимых различий в приросте сырой (ANOVA,  $F=1,06$ ;  $p=0,39$ ) и сухой (ANOVA,  $F=0,27$ ;  $p=0,90$ ) биомассы каллусной культуры (рис. 5, а и 6, а).

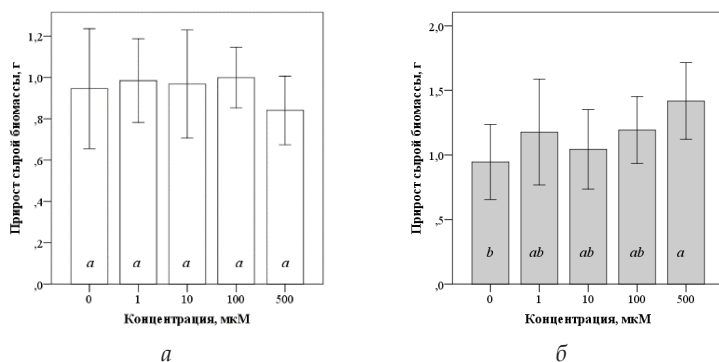


Рис. 5. Прирост сырой биомассы каллусной культуры *H. officinalis*, выращенной на среде МС-6 с добавлением фенилаланина (а) и тирозина (б).

Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )

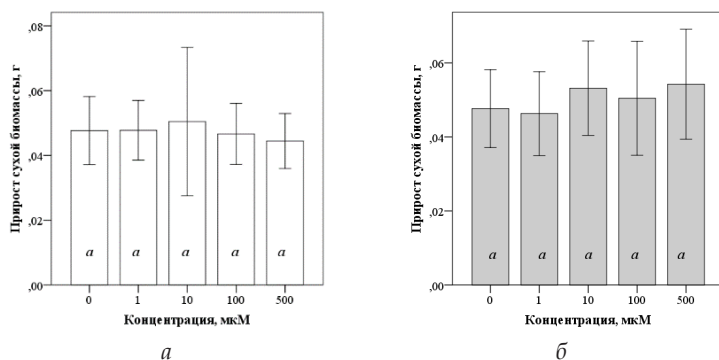


Рис. 6. Прирост сухой биомассы каллусной культуры *H. officinalis*, выращенной на среде МС-6 с добавлением фенилаланина (а) и тирозина (б).

Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )

Было установлено увеличение прироста сырой биомассы каллусной культуры с увеличением концентрации тирозина в среде MS-6 (ANOVA,  $F=3,17$ ;  $p=0,02$ ) (рис. 5, б). Однако статистически значимых различий в приросте сухой биомассы данной каллусной культуры выявлено не было (ANOVA,  $F=0,68$ ;  $p=0,61$ ) (рис. 6, б).



Ранее сообщалось о неоднозначном действии фенилаланина и тирозина на рост клеточной биомассы в растительных культурах *in vitro*. Результаты исследования каллусных культур *Hydrocotyle bonariensis* Comm. ex Lam показали, что фенилаланин в концентрации от 2 до 5 мг/л существенно не влияет на рост [28]. В другом исследовании говорилось, что более высокая концентрация тирозина (5 мМ) снижала прирост сухой биомассы клеточной культуры *Thalictrum minus* L., который составлял лишь 77 % от массы контрольной культуры [29]. В то же время при добавлении фенилаланина в концентрации 7 мМ прирост сухой биомассы замедлялся лишь на 5 %.

Наше исследование влияния разных концентраций фенилаланина и тирозина на рост каллусных культур *H. officinalis* не показало статистически значимых эффектов, повышающих прирост биомассы изучаемых культур.

### Влияние разных концентраций аминокислот на содержание фенольных соединений

*H. officinalis* содержит большое количество полифенольных соединений, фенольные и гидроксикоричные кислоты, такие как кофейная, розмариновая, феруловая, хлорогеновая и др. [4].

Анализ содержания фенольных соединений в каллусной культуре показал наличие влияния разных концентраций аминокислот. Так, максимальное содержание фенольных соединений в каллусной культуре *H. officinalis* (рис. 7, а) было установлено при добавлении 10 мкМ фенилаланина в питательную среду МС-2 ( $15,92 \pm 2,60$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ). В присутствии 1, 100 и 500 мкМ фенилаланина в питательной среде содержание фенольных соединений существенно не различалось в сравнении с контролем (0 мкМ) ( $8,50 \pm 0,64$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ).

В то же время наибольшее содержание фенольных соединений было зафиксировано при концентрации 100 мкМ тирозина ( $16,97 \pm 2,99$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ) в данной среде (рис. 7, б), что в 2 раза больше, чем в контроле (0 мкМ) ( $8,50 \pm 0,64$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ).

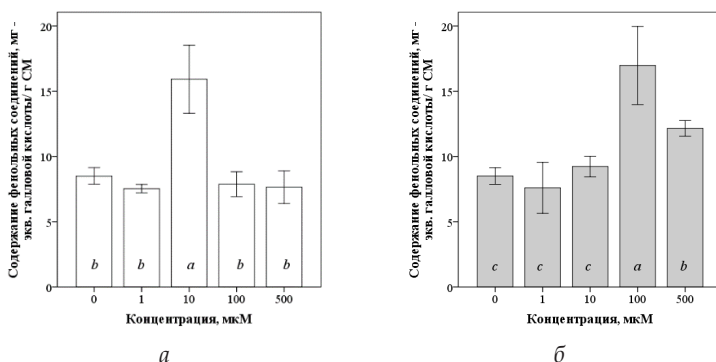


Рис. 7. Содержание фенольных соединений в каллусной культуре *H. officinalis*, выращенной на среде МС-2 с добавлением фенилаланина (а) и тирозина (б).

Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )



В каллусной культуре, культивируемой на питательной среде МС-5, было зафиксировано высокое содержание фенольных соединений при концентрации 10 мкМ фенилаланина ( $11,86 \pm 1,18$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ) (рис. 8, а). В то же время повышение содержания фенольных соединений наблюдалось при концентрации 100 и 500 мкМ тирозина в данной питательной среде — соответственно  $13,47 \pm 1,16$  и  $12,57 \pm 0,20$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ (рис. 8, б).

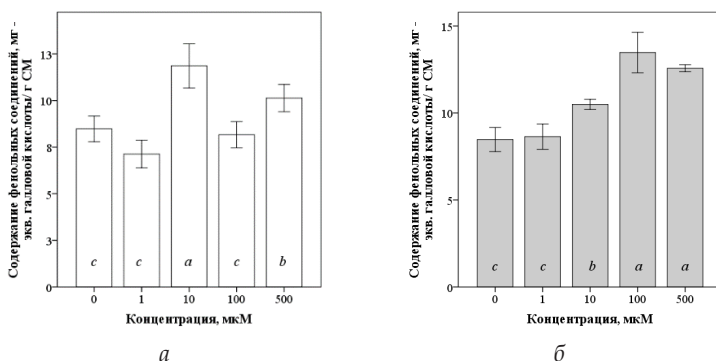


Рис. 8. Содержание фенольных соединений в каллусной культуре *H. officinalis*, выращенной на среде МС-5 с добавлением фенилаланина (а) и тирозина (б).

Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )

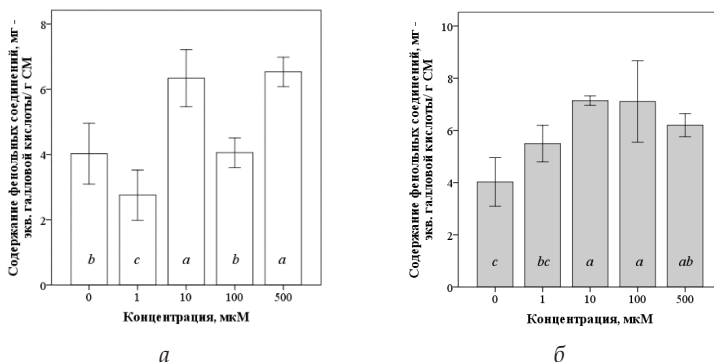
Общее содержание фенольных соединений в каллусной культуре, выращенной на среде МС-6 (рис. 9, а), было повышено в 1,5 раза по сравнению с контролем ( $4,02 \pm 0,93$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ) при внесении 10 мкМ ( $6,34 \pm 0,87$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ) и 500 мкМ ( $6,53 \pm 0,45$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ) фенилаланина. Наименьшее содержание фенольных соединений было показано при добавлении 1 мкМ фенилаланина ( $2,75 \pm 0,77$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ).

Высокое содержание фенольных соединений в культуре МС-6 было зафиксировано при добавлении 10 мкМ ( $7,14 \pm 0,18$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ) и 100 мкМ ( $7,10 \pm 1,56$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ) тирозина (рис. 9, б). В целом при добавлении тирозина в питательную среду МС-6 содержание фенольных соединений в каллусной культуре было выше по сравнению с контролем ( $2,75 \pm 0,77$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ).

Сообщалось, что содержание фенольных соединений в нативном растении *H. officinalis* составляет  $4,70 \pm 0,04$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ [5]. Полученные нами данные показывают, что добавление в питательную среду МС-2 фенилаланина в концентрации 10 мкМ ( $15,92 \pm 2,6$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ) и тирозина в концентрации 100 мкМ ( $16,97 \pm 2,99$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ) повышает общее количество фенольных соединений в 4 раза. Также добавление в питательную среду МС-5 10 мкМ фенилаланина ( $11,86 \pm 1,18$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ) и тирозина в концентрации 100 мкМ ( $13,47 \pm 1,16$  мг —



экв. галловой кислоты/г СМ) и 500 мкМ ( $12,57 \pm 0,20$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ) приводит к повышению фенольных соединений. Для каллусной культуры, выращенной на среде МС-6, было установлено повышение содержания фенольных соединений при внесении в питательную среду 10 мкМ ( $6,34 \pm 0,87$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ) и 500 мкМ ( $6,53 \pm 0,45$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ) фенилаланина, а также 10 мкМ ( $7,14 \pm 0,18$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ) и 100 мкМ ( $7,10 \pm 1,56$  мг — экв. галловой кислоты/г СМ) тирозина.



Содержание фенольных соединений в каллусной культуре *H. officinalis*, выращенной на среде МС-6 с добавлением фенилаланина (а) и тирозина (б).

Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )

Среди фенольных соединений *H. officinalis* преобладают гидроксикоричные кислоты, содержание которых составляет 72,5 % от суммы фенольных соединений [5]. В нашем исследовании показано влияние разных концентраций фенилаланина на содержание гидроксикоричных кислот в трех каллусных культурах *H. officinalis*.

Высокое содержание гидроксикоричных кислот зафиксировано у каллусной культуры, выращенной на среде МС-2, с внесением 10 мкМ фенилаланина ( $15,92 \pm 2,61$  мг — экв. розмариновой кислоты/г СМ) (рис. 10, а). Также наблюдалось высокое содержание гидроксикоричных кислот в каллусной культуре при добавлении в питательную среду МС-2 тирозина в концентрации 100 мкМ ( $16,97 \pm 2,99$  мг — экв. розмариновой кислоты/г СМ) (рис. 10, б).

Для каллусной культуры, выращенной на среде МС-5 (рис. 11, а), при добавлении разных концентраций фенилаланина содержание гидроксикоричных кислот было повышено почти в 2 раза в присутствии 10 мкМ ( $4,43 \pm 1,11$  мг — экв. розмариновой кислоты/г СМ) фенилаланина по сравнению с контролем ( $2,92 \pm 0,57$  мг — экв. розмариновой кислоты/г СМ).

Как видно из рисунка 11, б, общее содержание гидроксикоричных кислот в каллусной культуре также было повышено в 2 раза при добавлении в питательную среду тирозина в концентрации 100 мкМ ( $9,25 \pm 1,17$  мг — экв. розмариновой кислоты/г СМ) по сравнению с контролем ( $4,38 \pm 0,77$  мг — экв. розмариновой кислоты/г СМ).

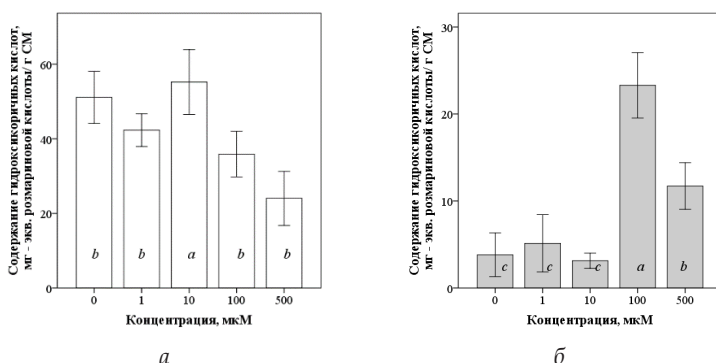


Рис. Содержание гидроксикоричных кислот в каллусной культуре *H. officinalis*, выращенной на среде МС-2 с добавлением фенилаланина (а) и тирозина (б). Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )

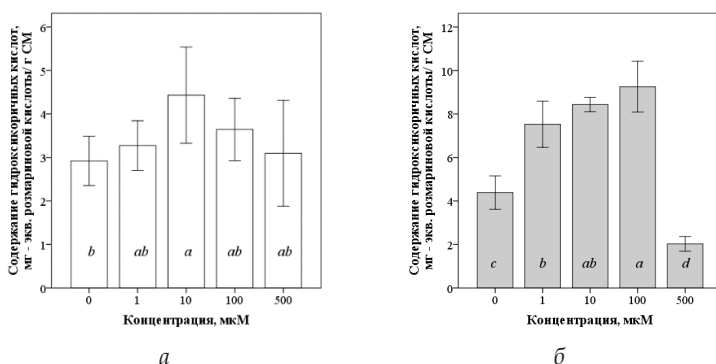


Рис. 11. Содержание гидроксикоричных кислот в каллусной культуре *H. officinalis*, выращенной на среде МС-5 с добавлением фенилаланина (а) и тирозина (б). Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )

Для каллусной культуры, выращенной на среде MS-6 (рис. 12, а), общее содержание гидроксикоричных кислот было максимальным при добавлении 10 мкМ ( $7,59 \pm 0,78$  мг – экв. розмариновой кислоты/г СМ), 100 мкМ ( $6,35 \pm 0,45$  мг – экв. розмариновой кислоты/г СМ) и 500 мкМ ( $6,63 \pm 1,20$  мг – экв. розмариновой кислоты/г СМ) фенилаланина. Наименьшее содержание гидроксикоричных кислот наблюдалось при концентрации фенилаланина 1 мкМ ( $3,97 \pm 0,26$  мг – экв. розмариновой кислоты/г СМ).

При добавлении разных концентраций тирозина в питательную среду MS-6 общее содержание гидроксикоричных кислот в каллусной культуре *H. officinalis* статистически значимо не изменялось (рис. 12, б).

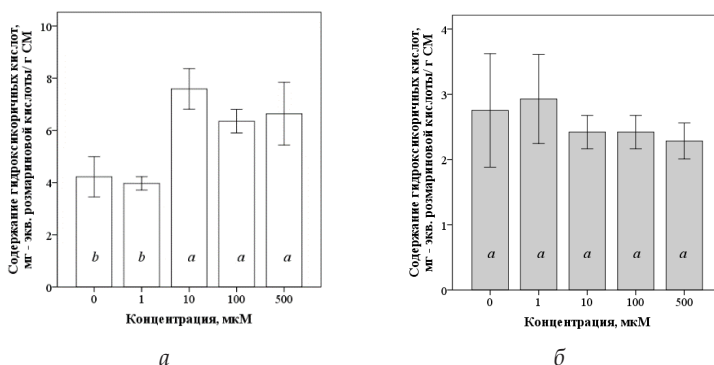


Рис. 12. Содержание гидроксикоричных кислот в каллусной культуре *H. officinalis*, выращенной на среде МС-6 с добавлением фенилаланина (а) и тирозина (б). Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )

### Влияние разных концентраций аминокислот на антиоксидантную активность

Оценка влияния разных концентраций аминокислот на антиоксидантную активность была проведена с помощью трех методов DPPH, ABTS и FRAP.

При добавлении фенилаланина в среду МС-2 максимальная антиоксидантная активность экстрактов каллусных культур, измеренная методом DPPH, была установлена при концентрации 1 мкМ ( $35,97 \pm 6,69$  мг — экв. аскорбиновой кислоты/г СМ) и 10 мкМ ( $37,79 \pm 5,14$  мг — экв. аскорбиновой кислоты/г СМ) (рис. 13, а). Однако значения антиоксидантной активности при этих концентрациях достоверно не различались со значением в контроле ( $38,21 \pm 4,11$  мг — экв. аскорбиновой кислоты/г СМ). Высокие концентрации фенилаланина (100 и 500 мкМ) приводили к понижению антиоксидантной активности каллусной культуры. В то же время при добавлении максимальной концентрации тирозина (500 мкМ) в питательную среду МС-2 наблюдалась наибольшая антиоксидантная активность ( $54,73 \pm 9,04$  мг — экв. аскорбиновой кислоты/г СМ) (рис. 13, б).

Определение антиоксидантной активности каллусной культуры, выращенной на среде МС-2, методом FRAP показало наивысшее значение при добавлении 100 мкМ фенилаланина ( $95,00 \pm 25,49$  мг — экв. аскорбиновой кислоты/г СМ) (рис. 14, а). В то же время концентрации тирозина не приводили к повышению антиоксидантной активности, наоборот, максимальная концентрация (500 мкМ) понижала антиоксидантную активность в 2 раза по сравнению с контролем (рис. 14, б).

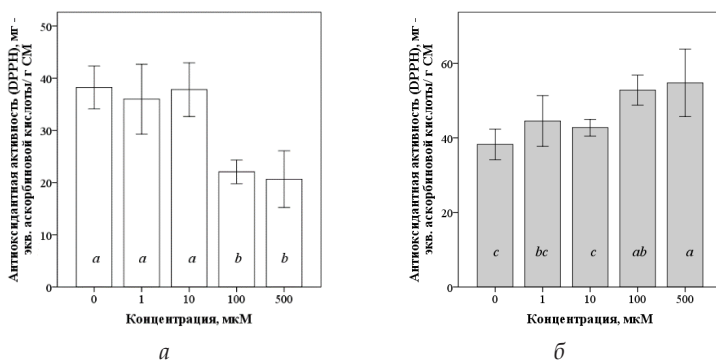


Рис. 13. Антиоксидантная активность (DPPH) экстрактов каллусных культур *H. officinalis*, выращенной на среде МС-2 с добавлением фенилаланина (а) и тирозина (б). Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )

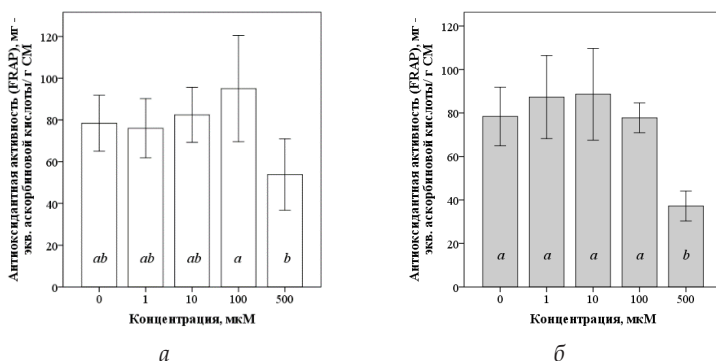


Рис. 14. Антиоксидантная активность (FRAP) экстрактов каллусных культур *H. officinalis*, выращенной на среде МС-2 с добавлением фенилаланина (а) и тирозина (б). Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )

Согласно методу ABTS была установлена максимальная антиоксидантная активность экстрактов каллусной культуры, выращенной на среде МС-2, при добавлении 10 мкМ фенилаланина ( $55,25 \pm 8,71$  мг – экв. аскорбиновой кислоты/г СМ) (рис. 15, а). Наименьшая антиоксидантная активность наблюдалась при самой высокой концентрации 500 мкМ фенилаланина ( $24,01 \pm 7,25$  мг – экв. аскорбиновой кислоты/г СМ) в питательной среде. В это же время при внесении в питательную среду МС-2 различных концентраций тирозина не было установлено статистически значимых различий в антиоксидантной активности экстрактов каллусной культуры (ANOVA,  $F = 1,41$ ;  $p = 0,26$ ) (рис. 15, б).

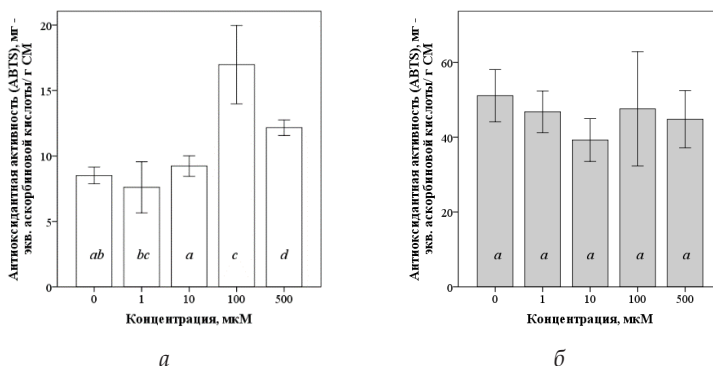


Рис. 15. Антиоксидантная активность (ABTS) экстрактов каллусных культур *H. officinalis*, выращенной на среде МС-2 с добавлением фенилаланина (а) и тирозина (б).  
 Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )

Проведенный анализ показал наличие значимых корреляций между концентрациями фенилаланина и антиоксидантной активностью (DPPH, FRAP, ABTS) каллусной культуры, выращенной на среде МС-2 (табл. 1). Сильная отрицательная связь была установлена между концентрациями фенилаланина и антиоксидантной активностью, измеренной методом ABTS ( $r = -0,76$ ;  $p \leq 0,01$ ). Также умеренная отрицательная связь наблюдалась между концентрациями фенилаланина и антиоксидантной активностью, измеренной методом DPPH ( $r = -0,68$ ;  $p \leq 0,01$ ) и FRAP ( $r = -0,49$ ;  $p \leq 0,01$ ).

Таблица 1

**Матрица корреляций фитохимических параметров каллусной культуры *H. officinalis*, выращенной на среде МС-2 с добавлением фенилаланина**

Параметр	СФС	СГК	DPPH	FRAP	ABTS
Концентрация фенилаланина	-0,307	-0,184	-0,681**	-0,493**	-0,757**
СФС	1	0,840**	0,359	0,105	0,547**
СГК	—	1	0,219	-0,043	0,351
DPPH	—	—	1	0,148	0,686**
FRAP	—	—	—	1	0,316
ABTS	—	—	—	—	1

\*\* Корреляция значима на уровне 0,01 (двухсторонняя).

СФС — общее содержание фенольных соединений; СГК — общее содержание гидроксикоричных кислот; DPPH — антиоксидантная активность, определяемая методом DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил); FRAP — железовосстанавливающая антиоксидантная активность; ABTS — антиоксидантная активность, определяемая методом ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота)).



В результате корреляционного анализа была установлена связь между концентрациями тирозина в питательной среде MS-2 и антиоксидантной активностью (DPPH и FRAP) (табл. 2). Высокая отрицательная степень корреляции была установлена между концентрациями тирозина и антиоксидантной активностью, измеренной методом FRAP ( $r = -0,80$ ;  $p \leq 0,01$ ). Умеренная положительная корреляция была зафиксирована между концентрациями тирозина и антиоксидантной активностью, измеренной методом DPPH ( $r = 0,59$ ;  $p \leq 0,01$ ).

Таблица 2

**Матрица корреляций фитохимических параметров каллусной культуры *H. officinalis*, выращенной на среде MS-2 с добавлением тирозина**

Параметр	СФС	СГК	DPPH	FRAP	ABTS
Концентрация тирозина	0,340	0,321	0,592**	-0,797**	-0,050
СФС	1	0,923**	0,574**	-0,171	-0,002
СГК	—	1	0,608**	-0,170	0,080
DPPH	—	—	1	-0,399*	0,065
FRAP	—	—	—	1	0,009
ABTS	—	—	—	—	1

\*\* Корреляция значима на уровне 0,01 (двухсторонняя).

\* Корреляция значима на уровне 0,05 (двухсторонняя).

СФС — общее содержание фенольных соединений; СГК — общее содержание гидроксикоричных кислот; DPPH — антиоксидантная активность, определяемая методом DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил); FRAP — железозосстанавливающая антиоксидантная активность; ABTS — антиоксидантная активность, определяемая методом ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота)).

Методами DPPH ( $25,43 \pm 3,41$  мг — экв. аскорбиновой кислоты/г СМ), FRAP ( $122,61 \pm 99,04$  мг — экв. аскорбиновой кислоты/г СМ) и ABTS ( $59,60 \pm 9,06$  мг — экв. аскорбиновой кислоты/г СМ) была установлена максимальная антиоксидантная активность каллусной культуры при добавлении 10 мкМ фенилаланина в питательную среду MS-5 (рис. 16, а, 17, а и 18, а).

Также высокая антиоксидантная активность, определенная методом DPPH, была зафиксирована при добавлении тирозина в концентрациях 1 мкМ ( $46,14 \pm 3,10$  мг — экв. аскорбиновой кислоты/г СМ), 10 мкМ ( $43,27 \pm 1,92$  мг — экв. аскорбиновой кислоты/г СМ) и 100 мкМ ( $48,08 \pm 2,02$  мг — экв. аскорбиновой кислоты/г СМ) (рис. 16, б). Метод FRAP показал, что наибольшее значение антиоксидантной активности наблюдалось при добавлении 100 мкМ тирозина ( $133,89 \pm 27,74$  мг — экв. аскорбиновой кислоты/г СМ) (рис. 17, б). В свою очередь, самое высокое значение антиоксидантной активности каллусной культуры, согласно методу ABTS, было установлено при внесении 10 мкМ тирозина ( $55,69 \pm 11,96$  мг — экв. аскорбиновой кислоты/г СМ) в питательную среду MS-5 (рис. 18, б).

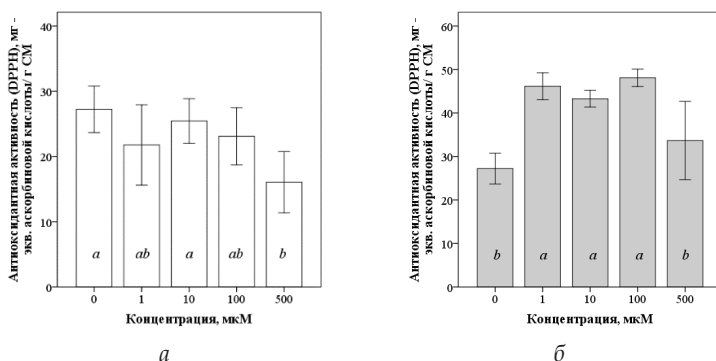


Рис. 16. Антиоксидантная активность (DPPH) экстрактов каллусных культур *H. officinalis*, выращенной на среде МС-5 с добавлением фенилаланина (а) и тирозина (б). Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )

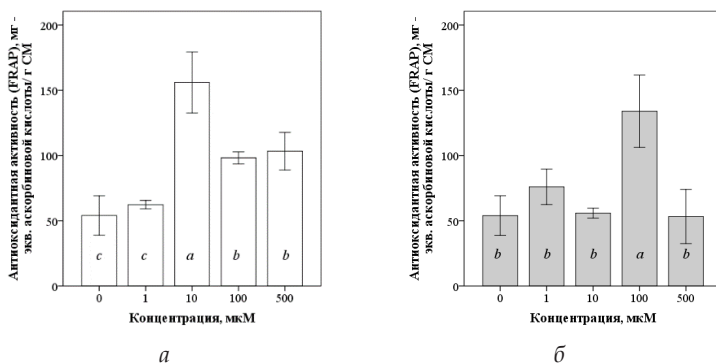


Рис. 17. Антиоксидантная активность (FRAP) экстрактов каллусных культур *H. officinalis*, выращенной на среде МС-5 с добавлением фенилаланина (а) и тирозина (б). Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )

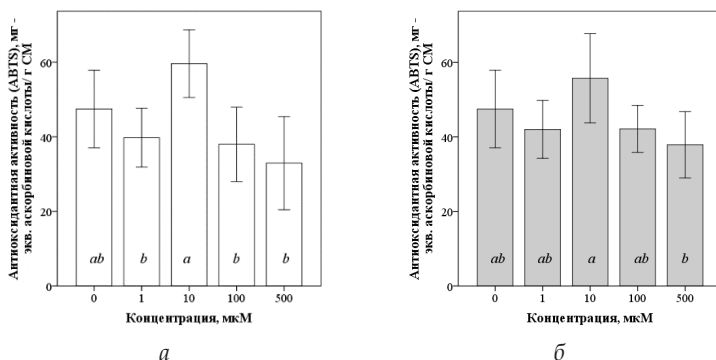


Рис. 18. Антиоксидантная активность (ABTS) экстрактов каллусных культур *H. officinalis*, выращенной на среде МС-5 с добавлением фенилаланина (а) и тирозина (б). Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )





Проведенный корреляционный анализ показал наличие отрицательной умеренной связи между концентрациями фенилаланина и антиоксидантной активностью определенной методом DPPH ( $r = -0,6$ ;  $p \leq 0,01$ ) и ABTS ( $r = -0,45$ ;  $p \leq 0,05$ ) (табл. 3).

Таблица 3

**Матрица корреляций фитохимических параметров  
кallусной культуры *H. officinalis*, выращенной на среде МС-5  
с добавлением фенилаланина**

Параметр	СФС	СГК	DPPH	FRAP	ABTS
Концентрация фенилаланина	0,236	0,341	-0,601**	0,140	-0,453*
СФС	1	0,721**	0,025	0,736**	0,306
СГК	—	1	-0,195	0,828**	0,079
DPPH	—	—	1	0,003	0,420*
FRAP	—	—	—	1	0,345
ABTS	—	—	—	—	1

\* Корреляция значима на уровне 0,05 (двухсторонняя).

\*\* Корреляция значима на уровне 0,01 (двухсторонняя).

СФС — общее содержание фенольных соединений; СГК — общее содержание гидроксикоричных кислот; DPPH — антиоксидантная активность, определяемая методом DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил); FRAP — железовосстанавливающая антиоксидантная активность; ABTS — антиоксидантная активность, определяемая методом ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота)).

По результатам корреляционного анализа были выявлено наличие значимых корреляций между концентрациями тирозина в питательной среде МС-5 и содержанием фенольных соединений, гидроксикоричных кислот и антиоксидантной активностью (ABTS) (табл. 4). Умеренная положительная связь была установлена между концентрациями тирозина и содержанием фенольных соединений ( $r = 0,62$ ;  $p \leq 0,01$ ). Также умеренная отрицательная связь наблюдалась между концентрациями тирозина и содержанием гидроксикоричных кислот ( $r = 0,68$ ;  $p \leq 0,01$ ), антиоксидантной активностью, измеренной методом ABTS ( $r = -0,37$ ;  $p \leq 0,05$ ).

Таблица 4

**Матрица корреляций фитохимических параметров  
кallусной культуры *H. officinalis*, выращенной на среде МС-5  
с добавлением тирозина**

Параметр	СФС	СГК	DPPH	FRAP	ABTS
Концентрация тирозина	0,624**	-0,678**	-0,244	-0,146	-0,373*
СФС	1	-0,034	0,217	0,523**	-0,331
СГК	—	1	0,700**	0,612**	-0,258
DPPH	—	—	1	0,593**	0,101



Параметр	СФС	СГК	DPPH	FRAP	ABTS
FRAP	—	—	—	1	-0,053
ABTS	—	—	—	—	1

\* Корреляция значима на уровне 0,05 (двухсторонняя).

\*\* Корреляция значима на уровне 0,01 (двухсторонняя).

СФС – общее содержание фенольных соединений; СГК – общее содержание гидроксикоричных кислот; DPPH – антиоксидантная активность, определяемая методом DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил); FRAP – железовосстанавливающая антиоксидантная активность; ABTS – антиоксидантная активность, определяемая методом ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоно-вая кислота)).

Согласно методу DPPH экстракт каллусной культуры на среде MS-6 показал высокую антиоксидантную активность при внесении 100 мкМ (33,03 ± 5,24 мг – экв. аскорбиновой кислоты/г СМ) и 500 мкМ (31,21 ± 3,47 мг – экв. аскорбиновой кислоты/г СМ) фенилаланина в питательную среду (рис. 19, а). Также максимальная антиоксидантная активность данной каллусной культуры была зафиксирована при добавлении 1 (38,56 ± 3,34 мг – экв. аскорбиновой кислоты/г СМ) и 10 (40,58 ± 4,52 мг – экв. аскорбиновой кислоты/г СМ) мкМ тирозина в питательную среду (рис. 19б). В целом концентрации тирозина (1 – 500 мкМ) в питательной среде MS-6 приводили к достоверному повышению антиоксидантной активности почти в 4 раза по сравнению с контролем.

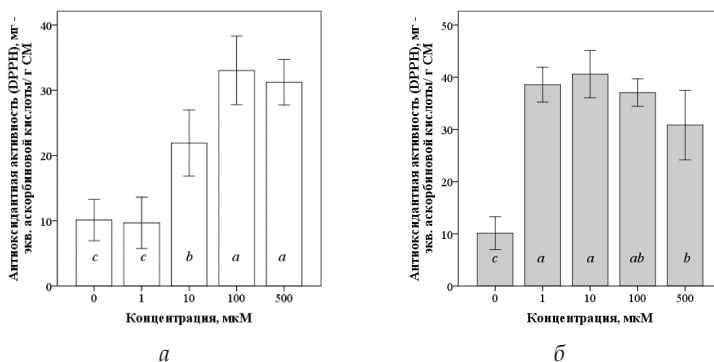


Рис. 19. Антиоксидантная активность (DPPH) экстрактов каллусных культур *H. officinalis*, выращенной на среде MS-6 с добавлением фенилаланина (а) и тирозина (б).

Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )

Определение антиоксидантной активности методом FRAP (рис. 20, а) для каллусной культуры, выращенной на среде MS-6, показало повышение активности при концентрации фенилаланина 100 мкМ (66,29 ± 7,98 мг – экв. аскорбиновой кислоты/г СМ), по сравнению с

контролем ( $38,50 \pm 10,23$  мг — экв. аскорбиновой кислоты/г СМ). В свою очередь, методом ABTS (рис. 21, а) было установлено снижение антиоксидантной активности при добавлении разных концентраций фенилаланина.

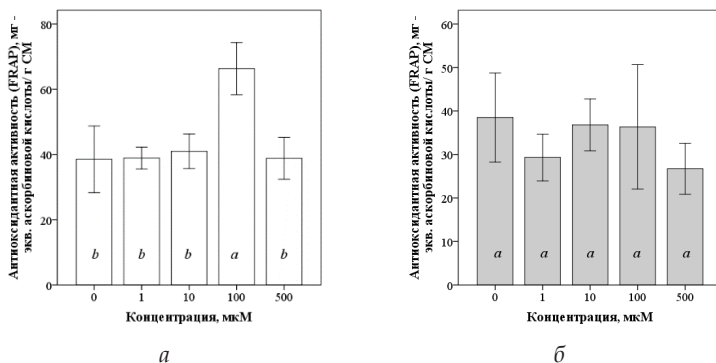


Рис. 20. Антиоксидантная активность (FRAP) экстрактов каллусных культур *H. officinalis*, выращенной на среде МС-6 с добавлением фенилаланина (а) и тирозина (б). Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )

Как мы видим из рисунка 20, б, не было установлено статистически значимых различий в повышении антиоксидантной активности каллусной культуры *H. officinalis* согласно методу FRAP при добавлении различных концентраций тирозина в питательной среде МС-6 (ANOVA,  $F=1,98$ ;  $p=0,13$ ). То же самое показало определение антиоксидантной активности методом ABTS (ANOVA,  $F=2,209$ ;  $p=0,1$ ) (рис. 21, б).

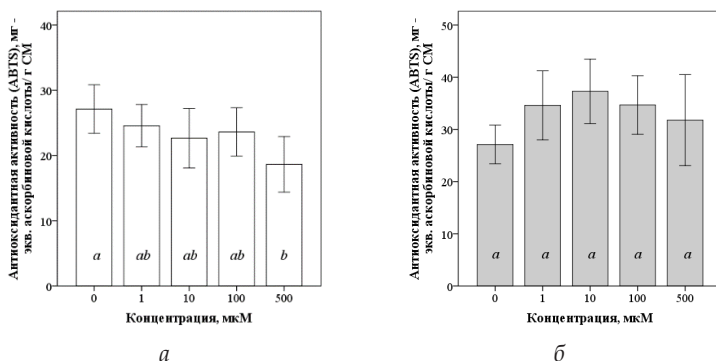


Рис. 21. Антиоксидантная активность (ABTS) экстрактов каллусных культур *H. officinalis*, выращенной на среде МС-6 с добавлением фенилаланина (а) и тирозина (б). Разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA, тест Тьюки (HSD),  $p \leq 0,05$ )

По результатам корреляционного анализа были выявлено наличие значимых корреляций между концентрациями фенилаланина в пита-



тельной среде МС-6 и содержанием фенольных соединений, антиоксидантной активностью, измеренной методами DPPH и ABTS (табл. 5). Умеренная положительная связь была установлена между концентрациями фенилаланина и содержанием фенольных соединений ( $r=0,54$ ;  $p \leq 0,01$ ), а также антиоксидантной активностью, измеренной методом DPPH ( $r=0,6$ ;  $p \leq 0,01$ ). В то же время между концентрациями фенилаланина и антиоксидантной активностью, измеренной методом ABTS, была зафиксирована умеренная отрицательная связь ( $r=0,47$ ;  $p \leq 0,01$ ).

Таблица 5

**Матрица корреляций фитохимических параметров каллусной культуры *H. officinalis*, выращенной на среде МС-6 с добавлением фенилаланина**

121

Параметр	Концентрация фенилаланина	СФС	СГК	DPPH	FRAP	ABTS
Концентрация фенилаланина	1	0,544**	-0,175	0,601**	-0,068	-0,475**
СФС	—	1	0,265	0,489**	-0,129	-0,102
СГК	—	—	1	0,241	0,274	-0,157
DPPH	—	—	—	1	0,515**	-0,377*
FRAP	—	—	—	—	1	0,071
ABTS	—	—	—	—	—	1

\* Корреляция значима на уровне 0,05 (двухсторонняя).

\*\* Корреляция значима на уровне 0,01 (двухсторонняя).

СФС — общее содержание фенольных соединений; СГК — общее содержание гидроксикоричных кислот; DPPH — антиоксидантная активность, определяемая методом DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил); FRAP — железовосстанавливающая антиоксидантная активность; ABTS — антиоксидантная активность, определяемая методом ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота)).

Проведенный корреляционный анализ не показал наличие значимых корреляций между концентрациями тирозина в питательной среде МС-6 и остальными показателями (табл. 6).

Таблица 6

**Матрица корреляций фитохимических параметров каллусной культуры *H. officinalis*, выращенной на среде МС-2 с добавлением тирозина**

Параметр	Концентрация тирозина	СФС	СГК	DPPH	FRAP	ABTS
Концентрация тирозина	1	0,165	-0,337	0,032	-0,340	-0,070
СФС	—	1	0,297	0,623**	0,396*	0,363*
СГК	—	—	1	0,082	0,495**	0,267
DPPH	—	—	—	1	-0,116	0,577**



Параметр	Концентрация тирозина	СФС	СГК	DPPH	FRAP	ABTS
FRAP	–	–	–	–	1	-0,026
ABTS	–	–	–	–	–	1

\* Корреляция значима на уровне 0,05 (двухсторонняя).

\*\* Корреляция значима на уровне 0,01 (двухсторонняя).

СФС – общее содержание фенольных соединений; СГК – общее содержание гидроксикоричных кислот; DPPH – антиоксидантная активность, определяемая методом DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил); FRAP – железовосстанавливающая антиоксидантная активность; ABTS – антиоксидантная активность, определяемая методом ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота)).

### Заключение

В ходе проведения исследования влияния различных концентраций фенилаланина и тирозина на рост каллусных культур *H. officinalis* не было выявлено статистически значимых эффектов, повышающих прирост биомассы исследуемых каллусных культур.

Для каллусной культуры *H. officinalis*, выращенной на среде МС-2, было установлено повышение общего содержания фенольных соединений и гидроксикоричных кислот при внесении 10 мкМ фенилаланина и 100 мкМ тирозина. Также было выявлено повышение антиоксидантной активности экстракта каллусной культуры при добавлении в питательную среду 100 мкМ фенилаланина (согласно методу FRAP), 500 мкМ тирозина (согласно методу DPPH) и 10 мкМ фенилаланина (согласно методу ABTS).

Повышение общего содержания фенольных соединений и гидроксикоричных кислот для каллусной культуры *H. officinalis*, выращенной на среде МС-5, наблюдалось при добавлении 10 мкМ фенилаланина. Также общее содержание фенольных соединений в экстракте данной каллусной культуры было повышено при концентрации 100 и 500 мкМ тирозина в питательной среде, а общее содержание гидроксикоричных кислот – при концентрации 100 мкМ тирозина. Антиоксидантная активность экстракта данной каллусной культуры была максимальной при концентрации 10 мкМ фенилаланина и концентрациям тирозина 1, 10 и 100 мкМ в питательной среде (согласно методам DPPH, FRAP и ABTS).

Каллусная культура *H. officinalis*, выращенная на среде МС-6, показала высокое содержание фенольных соединений при добавлении в питательную среду 10 и 500 мкМ фенилаланина, а также 10 и 100 мкМ тирозина. Общее содержание гидроксикоричных кислот было повышено при внесении в питательную среду 10, 100 и 500 мкМ фенилаланина. Согласно методам DPPH и FRAP повышение антиоксидантной активности экстракта данной каллусной культуры было зафиксировано при концентрации 100 и 500 мкМ фенилаланина, а также при концентрации 1 и 10 мкМ тирозина в питательной среде.

Таким образом, добавление аминокислот в оптимальной концентрации может повысить выработку биологически активных веществ. В исследованиях других клеточных культур растений семейства Lamiaceae сообщалось о положительном влиянии фенилаланина и тирозина на



биосинтез вторичных метаболитов [30–33]. Например, добавление фенилаланина в концентрации 0,25 г/л приводило к более высокому накоплению розмариновой кислоты (в 4,1 раза) в клеточной культуре *Ocimum sanctum* L. по сравнению с контролем [32]. В то же время при исследовании содержания фенолов в каллусной ткани *Coleus blumei* Benth. наибольшее значение было зафиксировано при добавлении 0,2 г/л тирозина, в то время как при добавлении фенилаланина были показаны более низкие значения [33].

В нашем исследовании аминокислоты фенилаланин и тирозин оказывают недостаточное стимулирующее влияние на рост и биосинтез вторичных метаболитов, в связи с этим использование данных аминокислот в качестве элиситоров для исследуемых каллусных культур *H. officinalis* не видится перспективным.

### Список литературы

1. Kumar V., Kaur N., Kaur A. et al. Phytochemistry and Pharmacology of Indian Traditional Plant Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.): A Review // The Natural Products Journal. 2023. Vol. 13, №4. P. 11–41.
2. Grigore A., Colceru-Mihul S., Bubueanu C. et al. Chemical composition and antioxidant activity of *Hyssopus officinalis* L. selective fractions obtained by different methods. 2019.
3. Ortiz de Elguea-Culebras G. Sánchez-Vioque R., Berruga M.I. et al. Biocidal potential and chemical composition of industrial essential oils from *Hyssopus officinalis*, *Lavandula× intermedia* var. super, and *Santolina chamaecyparissus* // Chemistry & Biodiversity. 2018. Vol. 15, №1. P. e1700313.
4. Judžentienė A. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Vilnius, 2016. Ch. 53. P. 471–479.
5. Tahir M., Khushhtar M., Fahad M. et al. Phytochemistry and pharmacological profile of traditionally used medicinal plant Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) // Applied Pharmaceutical Science. 2018. Vol. 8, №7. P. 132–140.
6. Zayova E., Geneva M., Stancheva I. et al. Evaluation of the antioxidant potential of in vitro propagated hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) with different plant growth regulators // Medicinal Plants-International Journal of Phytomedicines and Related Industries. 2018. Vol. 10, №4. P. 295–304.
7. Mobaiyen H., Jafari-Sales A. Antibacterial effects of methanolic extracts of *Reum ribes* L. and *Hyssopus officinalis* on some standard pathogenic bacteria // Jorjani Biomedicine Journal. 2019. Vol. 7, №3. P. 34–44.
8. Гребенникова О. А., Палий А. Е., Хлыпенко Л. А. и др. Биологически активные вещества *Hyssopus officinalis* L // Орбита. 2017. №1. С. 21–28.
9. Shekarchi M., Hajimehdipoor H., Saeidnia S. et al. Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of *Labiatae* family // Pharmacognosy magazine. 2012. Vol. 8, №29. P. 37–41.
10. Bernatoniene J., Cizauskaite U., Ivanauskas L. et al. Novel approaches to optimize extraction processes of ursolic, oleanolic and rosmarinic acids from *Rosmarinus officinalis* leaves // Industrial Crops and Products. 2016. Vol. 84. P. 72–79.
11. Razboršek M. I. Stability studies on trans-rosmarinic acid and GC-MS analysis of its degradation product // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2011. Vol. 55, №5. P. 1010–1016.
12. Efferth T. Biotechnology applications of plant callus cultures // Engineering. 2019. T. 5, №1. С. 50–59.



13. Wang S., Cizauskaite U., Ivanauskas L. et al. Effect of elicitors, precursors and metabolinhibitors on paclitaxel production by *Taxus cuspidata* cell culture // J. For. Res. 2016. Vol. 27, №6. P. 1257–1263.
14. Veeresham Ciddi V. C., Shuler M. L. Camptothecin from callus cultures of *Nothapodytes foetida* // Biotechnology Letters. 2000.
15. Martino E., Casamassima G., Castiglione S. et al. Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead // Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2018. Vol. 28, №17. P. 2816–2826.
16. Echeverri J. P., Ortega I. C., Peñuela M. A. et al. Antimicrobial activity of callus and cell suspension cultures extracts of *Thevetia peruviana* // Revista de la Facultad de Ciencias. 2019. Vol. 8, №1. P. 45–56.
17. Kayani W. K., Kiani B. H., Dilshad E. et al. Biotechnological approaches for artemisinin production in *Artemisia* // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2018. Vol. 34. P. 1–14.
18. Benjamin E. D., Ishaku G. A., Peingurta F. A. et al. Callus culture for the production of therapeutic compounds // American Journal of Plant Biology. 2019. Vol. 4, №4. P. 76–84.
19. Babich O., Sukhik, S., Pungin A. et al. Evaluation of the conditions for the cultivation of callus cultures of *Hyssopus officinalis* regarding the yield of polyphenolic compounds // Plants. 2021. Vol. 10, №5. P. 915.
20. Chandran H., Meena M., Barupal T. et al. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds // Biotechnology reports. 2020. Vol. 26. P. e00450.
21. Szoke E., Krajewska A. NMR characterisation of lobeline from *Lobelia inflata* tissue cultures // Medical Science Monitor. 1998. Vol. 4, №1. P. BR15–BR19.
22. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiologia plantarum. 1962. Vol. 15 (3). P. 473–497.
23. Padhi E. M. T., Liu R., Hernandez M. et al. Total polyphenol content, carotenoid, tocopherol and fatty acid composition of commonly consumed Canadian pulses and their contribution to antioxidant activity // Journal of Functional Foods. 2017. Vol. 38. P. 602–611.
24. Štefan M. B., Vuković Rodríguez J., Blažeković B. et al. Total hydroxycinnamic acids assay: Prevalidation and application on *Lamiaceae* species // Food Analytical Methods. 2014. Vol. 7. P. 326–336.
25. Feduraev P., Skrypnik L., Nebreeva S. et al. Variability of phenolic compound accumulation and antioxidant activity in wild plants of some *Rumex* species (*Polygonaceae*) // Antioxidants. 2022. Vol. 11, №2. P. 311.
26. Skrypnik L., Feduraev P., Golovin A. et al. Biotechnological potential of different organs of mistletoe (*Viscum album* L.) collected from various host tree species in an urban area // Plants. 2022. Vol. 11, №20. P. 2686.
27. Demirci T., Çelikkol Akçay U., Göktürk Baydar N. Effects of 24-epibrassinolide and l-phenylalanine on growth and caffeic acid derivative production in hairy root culture of *Echinacea purpurea* L. Moench // Acta Physiologiae Plantarum. 2020. Vol. 42, №4. P. 1–11.
28. Masoumian M., Arbakariya A., Syahida A. et al. Effect of precursors on flavonoid production by *Hydrocotyle bonariensis* callus tissues // African Journal of Biotechnology. 2011. Vol. 10, №32. P. 6021–6029.
29. Urmantseva V. V., Gaevsкая, O. A., Karyagina, T. B. et al. The effect of amino acids as components of nutrient medium on the accumulation of protoberberine alkaloids in the cell culture of *Thalictrum minus* // Russian Journal of Plant Physiology. 2005. Vol. 52. P. 388–391.



30. Pavlov A., Ilieva M. The influence of phenylalanine on accumulation of rosmarinic and caffeic acids by *Lavandula vera* MM cell culture // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 1999. Vol. 15. P. 397–399.

31. Sahraroo A., Mirjalili M.H., Corchete P. et al. Enhancement of rosmarinic acid production by *Satureja khuzistanica* cell suspensions: effects of phenylalanine and sucrose // SABRAO Journal of Breeding & Genetics. 2018. Vol. 50, №1. P. 25–35.

32. Hakkim F.L., Kalyani S., Essa M. et al. Production of rosmarinic in *Ocimum sanctum* cell cultures by the influence of sucrose, phenylalanine, yeast extract, and methyl jasmonate // Int J Biol Med Res. 2011. Vol. 2, №4. P. 1070–1074.

33. Musbah H.M., Ibrahim K.M., Ibrahim K. Effects of feeding tyrosine or phenylalanine on the accumulation of polyphenols in *Coleus Blumei* in Vivo and in Vitro // Journal of Biotechnology Research Center. 2019. Vol. 13, №1. P. 35–43.

### Об авторах

Елена Александровна Попова — асп., Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Россия.

E-mail: elena\_popova97@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0001-7008-3823>

Артем Викторович Пунгин — канд. геогр. наук, доц. Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Россия.

E-mail: APungin@kantiana.ru

<https://orcid.org/0000-0001-8374-3907>

Анастасия Павловна Пантюхина — студентка, Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Россия.

E-mail: pantuhinaanastasia42@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0009-5907-290X>

***E. A. Popova, A. V. Pungin, A. P. Pantyukhina***

## **INCREASED BIOSYNTHESIS OF SECONDARY METABOLITES IN CALLUS CULTURES OF *HYSSOPUS OFFICINALIS* L.**

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

Received 25 May 2024

Accepted 17 June 2024

doi: 10.5922/vestniknat-2024-3-8

**To cite this article:** Popova E. A., Pungin A. V., Pantyukhina A. P., 2024, Increased biosynthesis of secondary metabolites in callus cultures of *Hyssopus officinalis* L., *Vestnik of Immanuel Kant Baltic Federal University. Series: Natural and Medical Sciences*, №3. P. 102–126. doi: 10.5922/vestniknat-2024-3-8.

Currently, callus cultures of medicinal plants are actively used for the production of important biologically active compounds. Investigating conditions that enhance the biosynthesis of these compounds in callus cultures is highly relevant. This article examines the influence of various concentrations of phenylalanine and tyrosine (1–500  $\mu$ M) on the content of phenolic compounds and the antioxidant activity of three callus cultures of *Hyssopus officinalis* L. It





*was found that the addition of phenylalanine at a concentration of 10  $\mu\text{M}$  and tyrosine at a concentration of 100  $\mu\text{M}$  to the nutrient media leads to an increase in the content of phenolic compounds and hydroxycinnamic acids in the callus cultures. An increase in the antioxidant activity of the extracts from the studied callus cultures was recorded at phenylalanine concentrations of 10 and 100  $\mu\text{M}$ , as well as tyrosine concentrations of 1, 10, and 100  $\mu\text{M}$  in the nutrient media.*

**Keywords:** medicinal plant, callus culture, growth, biologically active substances, amino acids

#### The authors

126

Elena A. Popova, PhD student, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia.  
E-mail: elena\_popova97@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-7008-3823>

Dr Artem V. Pungin, Associate Professor, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia.  
E-mail: APungin@kantiana.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-8374-3907>

Anastasia P. Pantukhina Student, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia.  
E-mail: pantuhinaanastasia42@gmail.com  
<https://orcid.org/0009-0009-5907-290X>