

А. В. Пунгин, Е. А. Попова, Л. О. Ларцева

**ПОВЫШЕНИЕ СИНТЕЗА ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ
В КУЛЬТУРЕ БОРОДАТЫХ КОРНЕЙ
HYSSOPUS OFFICINALIS L.**

Поступила в редакцию 15.11.2021 г.

Рецензия от 19.12.2021 г.

98

*Проведена оценка влияния аминокислот (фенилаланина и тирозина) на рост и содержание биологически активных веществ в культуре бородачатых корней *Hyssopus officinalis*. Исследование влияния аминокислот на прирост сырой биомассы бородачатых корней *H. officinalis* показало, что при внесении в питательную среду фенилаланина и тирозина в концентрации 1 мкМ наблюдался максимальный прирост биомассы. Содержание биологически активных веществ в бородачатых корнях *H. officinalis*, таких как фенольные соединения, флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, и антиоксидантная активность экстрактов были выше при внесении в питательную среду тирозина по сравнению с добавками фенилаланина.*

*The research evaluates the effect of amino acids (phenylalanine and tyrosine) on the growth and content of biologically active substances in the culture of bearded roots of *Hyssopus officinalis*. The study of the effect of amino acids on the growth of raw biomass of bearded roots of *H. officinalis* showed that when phenylalanine and tyrosine were introduced into the nutrient medium at a concentration of 1 μM, the maximum increase in biomass was observed. The content of biologically active substances in the bearded roots of *H. officinalis*, such as phenolic compounds, flavonoids, hydroxycinnamic acids and the antioxidant activity of extracts, were higher when tyrosine was introduced into the nutrient medium compared with phenylalanine supplements.*

Ключевые слова: лекарственное растение, бородачатые корни, рост, биологически активные вещества, аминокислоты

Keywords: medicinal plant, hairy roots, growth, biologically active substances, amino acids

Введение

В настоящее время растет спрос на получение лекарственных веществ из растений, однако существуют ограничения в их использовании для данной цели. Это связано в первую очередь с сезонностью, ареалом произрастания и отсутствием обилия растительного материала. Поэтому использование подходов *in vitro* для ускорения получения нужных биологически активных веществ является актуальным.



Для исследования было выбрано растение семейства *Lamiaceae* – иссоп лекарственный (*Hyssopus officinalis* L.). В его состав входят эфирные масла, полифенолы, кислоты (хлорогеновая, пара-гидроксibenзойная, протокатехиновая, феруловая, сириговая, ванилиновая, пара-кумариновая, розмариновая, кофейная), флаваноиды, полисахариды, дубильные вещества, пигменты и смолы [1].

Биологически активные вещества, содержащиеся в иссопе лекарственном, обладают антиоксидантным, противосудорожным, противогрибковым, противомикробным, антигемолитическим, противовоспалительным и спазмолитическим свойствами [2–4].

Потенциальным источником биологически активных веществ может стать культура бородатых корней благодаря их генетической стабильности и относительно быстрому росту. К тому же культивирование бородатых корней не требует наличия в среде регуляторов роста, которые являются токсичными и присутствие которых в конечном продукте недопустимо. Для того чтобы содержание лекарственных веществ в используемой культуре было максимальным, необходимо подбирать определенные условия. Одним из способов повышения продукции вторичных метаболитов является внесение в среду их предшественников [5].

В связи с этим целью настоящего исследования стало изучение влияния различных концентраций аминокислот фенилаланина и тирозина на рост и биосинтез вторичных метаболитов культуры бородатых корней *H. officinalis*.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования была использована культура бородатых корней *H. officinalis*, полученная инокуляцией в суспензии штамма 8196 *Agrobacterium rhizogenes*. Культура выращивалась в колбе с жидкой средой Гамборга (B5) [6].

Оценка влияния аминокислот на рост культуры бородатых корней. В 50 мл среды B5 добавляли фенилаланин и тирозин в концентрации 1, 10, 100, 500 и 1000 мкМ в трех повторностях. В колбы помещали 4 г сырой биомассы бородатых корней и культивировали в течение 30 дней на орбитальном шейкере (100 об./мин) при температуре 25 °С в темноте [7]. По истечении данного времени взвешивали сырую биомассу. Культуры сушили в лиофильной сушке Triad фирмы Labconco. Лиофилизированные корни хранили в морозилке при –18 °С.

Получение экстрактов. В фарфоровой ступке растирали 0,5 г сухой биомассы бородатых корней и количественно переносили в колбы на 100 мл, добавляли 45 мл 70 %-ного этанола. Мацерацию проводили в течение суток на орбитальном шейкере (100 об./мин). После содержимое колб переливали в пробирки и центрифугировали в течение 20 мин при 3900 g на центрифуге Eppendorf 5810R. Далее супернатант переливали в мерную колбу на 50 мл и доводили объем 70 %-ным этанолом до метки.

Суммарное содержание фенольных соединений. Определение общего содержания фенольных соединений проводилось спектрофотометрическим методом с использованием реактива Фолина – Чокальтеу [8]. Для этого к 100 мкл экстракта добавляли 300 мкл реактива Фолина – Чокальтеу, 3 мл 11,5 %-ного раствора карбоната натрия, 2,6 мл дистиллиро-



ванной воды и перемешивали. В качестве раствора сравнения использовали дистиллированную воду. Через 20 мин измеряли поглощение растворов при длине волны 720 нм на спектрофотометре UNICO 1201. В качестве калибровочного стандарта использовали галловую кислоту. Суммарное содержание фенольных соединений оценивали по калибровочной кривой и выражали в мг эквивалентов галловой кислоты на грамм сухой массы.

Определение общего содержания гидроксикоричных кислот.

Суммарное содержание гидроксикоричных кислот оценивали спектрофотометрическим методом с использованием реактива Арно [9; 10]. К 1 мл растительного экстракта или стандартного раствора добавляли 2 мл 0,5 М HCl, 2 мл реагента Арно и 2 мл 8,5 %-ного NaOH. Весь объем раствора доводили до 10 мл дистиллированной водой. Раствор сравнения готовился отдельно для каждого экстракта без добавления реактива Арно. Поглощение растворов измеряли при 505 нм на спектрофотометре UNICO 1201. Для построения калибровочного графика использовалась розмариновая кислота. Суммарное содержание гидроксикоричных кислот оценивали по градуировочной кривой и выражали в мг эквивалентов хлорогеновой кислоты на грамм сухой массы.

Определение суммарного содержания флавоноидов. Общее содержание флавоноидов определяли спектрофотометрическим методом (UNICO 1201) на основе реакции комплексообразования с хлоридом алюминия [11]. Для этого к 1 мл экстракта добавляли 2 мл 2 %-ного раствора алюминия хлорида в 95 %-ном этаноле, 1 каплю разведенной уксусной кислоты и доводили объем раствора до 10 мл 95 %-ным этанолом. Раствор сравнения готовился для каждого экстракта без добавления 2 %-ного раствора хлорида алюминия. Через 30 мин измеряли поглощение растворов при 410 нм. В качестве калибровочного стандарта использовали рутин. Общее содержание флавоноидов выражали в мг эквивалентов рутина на грамм сухой массы.

Определение антиоксидантной активности. Антиоксидантную активность оценивали по методу DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) [12]. Для анализа брали 10, 20, 30 мкл экстракта и добавляли 2,85 мл раствора DPPH. Объем доводили до 3,1 мл этиловым спиртом. В качестве раствора сравнения вместо экстракта использовали смесь, содержащую раствор DPPH и 70 %-ный этанол. Растворы оставляли на 60 мин в темном месте, после чего измеряли снижение поглощения при 515 нм на спектрофотометре UV-3600 (Shimadzu, Япония). Для построения калибровочного графика использовалась аскорбиновая кислота. Антиоксидантную активность выражали в мг эквивалентов аскорбиновой кислоты на грамм сухой массы.

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 использовали параметрический однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки ($p \geq 0,05$) и непараметрический критерий Краскала – Уоллиса.



Результаты и обсуждение

Оценка влияния аминокислот на рост культуры бородатых корней. В некоторых исследованиях сообщалось, что высокие концентрации фенилаланина и тирозина в значительной степени предотвращают рост клеток [13]. Наши результаты показали, что с увеличением в питательной среде концентрации тирозина (ANOVA, $F \geq 38,811$; $p \leq 0,001$) и фенилаланина (ANOVA, $F \geq 5,071$; $p \leq 0,05$) уменьшается прирост сырой биомассы бородатых корней (рис. 1).

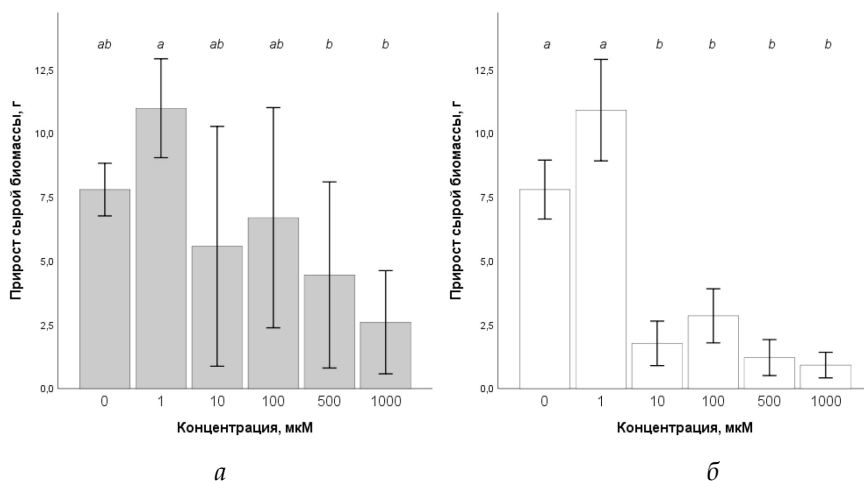


Рис. 1. Влияние различных концентраций аминокислот фенилаланина (а) и тирозина (б) на прирост сырой биомассы культуры бородатых корней *H. officinalis* (разными буквенными индексами обозначены статистически различающиеся данные (ANOVA, $p \leq 0,05$))

При анализе литературы не было найдено информации о влиянии аминокислот на рост *H. officinalis*. Однако в исследовании [14] о влиянии фенилаланина на культуру бородатых корней *Taxus x media var. Hicksii* наибольшая сухая биомасса зафиксирована при добавлении 1 мкМ фенилаланина ($6,2 \pm 0,4$ г).

Как видно из рисунка 1, наибольший прирост сырой биомассы бородатых корней *H. officinalis* также наблюдался в среде с добавлением 1 мкМ фенилаланина ($11,1 \pm 2,3$ г) и тирозина ($10,9 \pm 2,0$ г). Наименьший прирост сырой биомассы отмечался при добавлении в среду 1000 мкМ тирозина ($0,9 \pm 0,5$ г).

Химический анализ

Анализ литературы показал, что в *H. officinalis* содержатся полифенольные соединения, включая флавоноиды лютеолин, диосмин, кверцетин, апигенин и их глюкозиды, а также некоторые фенольные кислоты, такие как кофейная, п-гидроксибензойная, сиригговая, феруловая, протокатеховая, розмариновая и хлорогеновая [2].

В результате проведенного анализа установлено увеличение содержания фенольных соединений в бородачатых корнях при добавлении в питательную среду большей концентрации тирозина (ANOVA, $F \geq 59,6$, $p \leq 0,05$) (рис. 2).

Как видно из рисунка 2, б, высокое содержание фенольных соединений наблюдалось при концентрации тирозина 500 мкМ ($44,4 \pm 4,9$ мг/г) и 1000 мкМ ($40,3 \pm 2,8$ мг/г), что почти в 2,5 раза превышает содержание в контроле ($17,1 \pm 4,4$ мг/г).

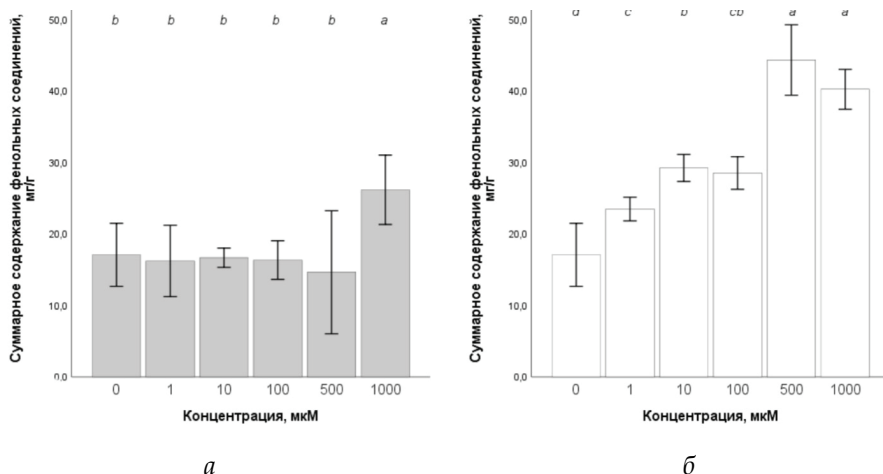


Рис. 2. Влияние различных концентраций аминокислот фенилаланина (а) и тирозина (б) на суммарное содержание фенольных соединений в культуре (разными буквенными индексами обозначены статистически различающиеся данные (ANOVA, $p \leq 0,05$))

В среде с добавлением фенилаланина (ANOVA, $F \geq 4,4$, $p \leq 0,05$) наибольшее статистически значимое содержание фенольных соединений зафиксировано при концентрации 1000 мкМ ($26,2 \pm 4,9$ мг/г), а наименьшее при концентрации 1 мкМ ($16,2 \pm 5,0$ мг/г).

По данным [2], в нативном растении *H. officinalis* общее содержание фенольных соединений составляет $4,70 \pm 0,04$ мг/г, что значительно ниже содержания в исследуемой культуре бородачатых корней.

Исследование влияния различных концентраций аминокислот на содержание гидроксикоричных кислот показало, что с увеличением в питательной среде концентрации тирозина наблюдается статистически значимое (ANOVA, $F \geq 32,9$, $p \leq 0,05$) повышение содержания гидроксикоричных кислот в культуре бородачатых корней *H. officinalis* (рис. 3).

В свою очередь, при внесении в питательную среду различных концентраций фенилаланина не выявлено статистически значимых различий (ANOVA, $F \geq 0,2$; $p > 0,05$) в содержании гидроксикоричных кислот в культуре бородачатых корней *H. officinalis*.

Как видно из рисунка 3, наибольшее содержание гидроксикоричных кислот наблюдалось при концентрации в питательной среде 500 мкМ ти-



розина ($9,1 \pm 1,8$ мг/г) и 1000 мкМ фенилаланина ($4,4 \pm 0,2$ мг/г). Наименьшее содержание гидроксикоричных кислот зафиксировано при концентрации 1 мкМ фенилаланина ($3,9 \pm 1,7$ мг/г) и тирозина ($4,7 \pm 0,2$ мг/г).

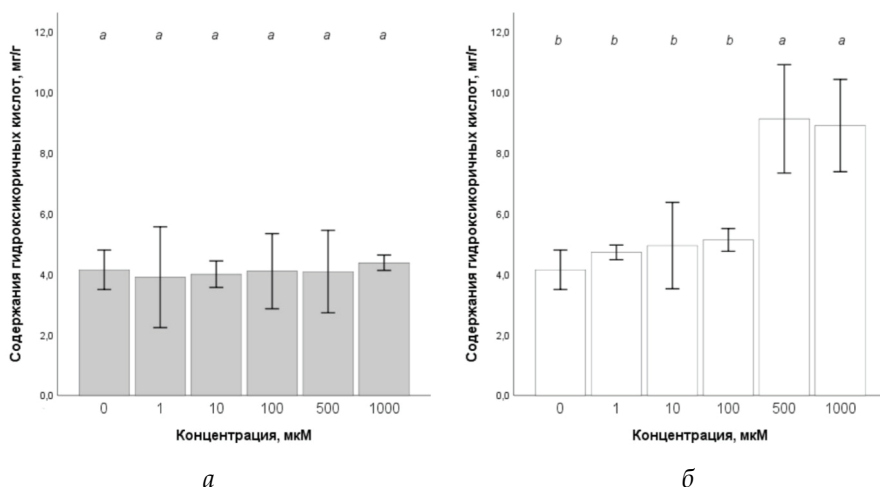


Рис. 3. Влияние различных концентраций аминокислот фенилаланина (а) и тирозина (б) на содержание гидроксикоричных кислот в культуре бородатых корней *H. officinalis* (разными буквенными индексами обозначены статистически различающиеся данные (ANOVA, $p \leq 0,05$))

Розмариновая кислота является одним из наиболее распространенных эфиров кофейной кислоты, встречающихся, в частности, в семействах *Lamiaceae*. Согласно литературным данным [15], содержание розмариновой кислоты в трансформированных корнях *H. officinalis*, культивируемых в среде В5 с содержанием 10%-ной сахарозы, составило $1,66 \pm 0,14$ мг/г, а количество других фенольных кислот колебалось от 0,05 до 21 мг на 100 г сухих корней.

Были установлены статистически значимые различия (ANOVA, $F \geq 11,3$; $p \leq 0,05$) в содержании флавоноидов в трансформированных корнях *H. officinalis* при повышении концентрации тирозина в питательной среде, однако анализ не показал статистически значимых различий в содержании флавоноидов в бородатых корнях с добавлением различных концентраций фенилаланина в питательную среду (ANOVA, $F \geq 2,4$; $p > 0,05$) (рис. 4).

При химическом анализе надземных частей нативного растения *H. officinalis* [16] выявлено общее содержание флавоноидов – 0,075 мг/г. В другом исследовании [2] количественное содержание флавоноидов в растении определено как $1,300 \pm 0,001$ мг/г, что сопоставимо с результатами нашего исследования. Так, например, наибольшее содержание ($1,8 \pm 0,5$ мг/г) флавоноидов отмечено при концентрации в питательной среде 1000 мкМ тирозина. В свою очередь, наименьшее содержание флавоноидов зафиксировано при концентрации 1 мкМ тирозина ($0,6 \pm 0,3$ мг/г) и 1 мкМ фенилаланина ($0,6 \pm 0,3$ мг/г).

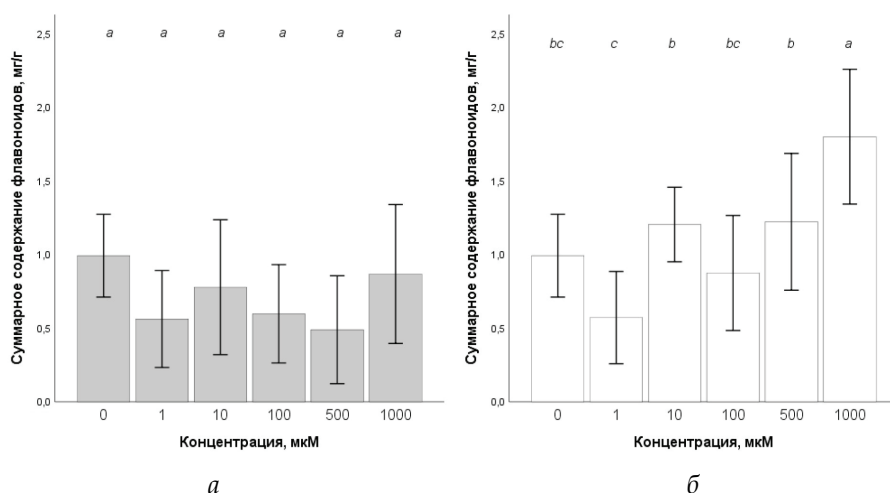


Рис. 4. Влияние различных концентраций аминокислот фенилаланина (а) и тирозина (б) на содержание флавоноидов в культуре бородачатых корней *H. officinalis* (разными буквенными индексами обозначены статистически различающиеся данные (ANOVA, $p \leq 0,05$))

Было установлено наличие значимых различий (ANOVA, $F \geq 19,8$; $p \leq 0,001$) в повышении антиоксидантной активности экстрактов бородачатых корней с увеличением концентраций тирозина в питательной среде (рис. 5). При культивировании бородачатых корней на средах с различными концентрациями фенилаланина значимых различий (ANOVA, $F \geq 2,4$; $p > 0,05$) в антиоксидантной активности выявлено не было.

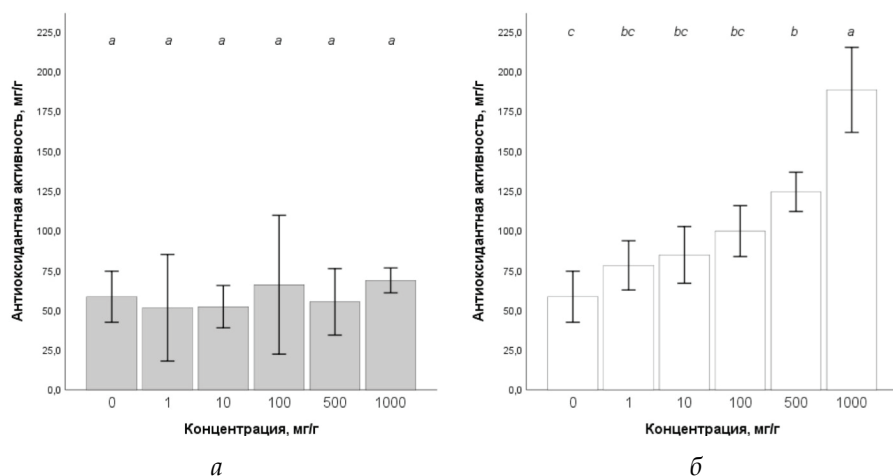


Рис. 5. Влияние различных концентраций аминокислот фенилаланина (а) и тирозина (б) на антиоксидантную активность культуры бородачатых корней *H. officinalis* (разными буквенными индексами обозначены статистически различающиеся данные (ANOVA, $p \leq 0,05$))



Показано, что наибольшая антиоксидантная активность наблюдалась у экстрактов бородатых корней (189 ± 27 мг-экв. аскорбиновой кислоты/г), культивируемых на среде с внесением тирозина в концентрации 1000 мкМ. Наименьшая антиоксидантная активность — на среде с добавлением тирозина (78 ± 15 мг-экв. аскорбиновой кислоты/г) и фенилаланина (51 ± 33 мг-экв. аскорбиновой кислоты/г) в концентрации 1 мкМ.

Во многих исследованиях сообщается о высокой антиоксидантной активности *H. officinalis* [2; 4; 17]. Пятидесятипроцентная ингибирующая концентрация (IC50) для поглощения DPPH составила $148,8 \pm 4,31$ мкг/мл для цветов, $208,2 \pm 6,45$ мкг/мл для листьев и $79,9 \pm 2,63$ мкг/мл для стеблей [2].

Заключение

Оценка влияния аминокислот на рост культуры бородатых корней *H. officinalis* показала, что высокие концентрации тирозина и фенилаланина уменьшают прирост сырой биомассы. Показано увеличение биосинтеза фенольных соединений при внесении в питательную среду высоких концентраций фенилаланина и тирозина.

Было установлено, что с повышением концентрации тирозина в питательной среде увеличивалось содержание гидроксикоричных кислот и флавоноидов в бородатых корнях *H. officinalis* и антиоксидантная активность исследуемых экстрактов. В свою очередь, при внесении в питательную среду различных концентраций фенилаланина содержание гидроксикоричных кислот, флавоноидов и антиоксидантная активность статистически значимо не изменялись.

На основании полученных данных можно рекомендовать добавление в питательную среду тирозина в исследованных концентрациях для повышения синтеза вторичных метаболитов в культуре бородатых корней *Hyssopus officinalis* L.

Список литературы

1. Judžentienė A. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Vilnius, 2015. Vol. 53. P. 471 – 479.
2. Tahir M., Khushtar M., Fahad M. et al. Phytochemistry and pharmacological profile of traditionally used medicinal plant Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) // Applied Pharmaceutical Science. 2018. P. 132 – 140.
3. Sayyahi J., Mobaiyen H., Jafari B., 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. 35 – 44.
4. Zayova E., Geneva M., Stancheva I. Evaluation of the antioxidant potential of in vitro propagated hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) with different plant growth regulators // Medicinal Plants. 2018. Vol. 10, №4. P. 295 – 304.
5. Roy A. Hairy Root Culture an Alternative for Bioactive Compound Production from Medicinal Plants // Current pharmaceutical biotechnology. 2021. Vol. 22, №1. P. 136 – 149.
6. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Experimental Cell Research. 1968. Vol. 50. P. 151 – 158.



7. Bálványos I., Szőke É., Kursinszki L. The influence of amino acids on the lobeline production of *Lobelia inflata* L. hairy root cultures // Plant growth regulation. 2002. Vol. 36, №3. P. 241–244.

8. Padhi E. M. T., Liu R., Hernandez M., Tsao R., Ramdath D. D. 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.

9. 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. <https://doi.org/10.3390/antiox11020311>.

10. Štefan M. B., Rodríguez J. V., Blažeković B. et al. Total hydroxycinnamic acids assay: Prevalidation and application on Lamiaceae species // Food Analytical Methods. 2014. Vol. 7, №2. P. 326–336.

11. ФС.2.5.0033.15. Польни горькой трава. URL: <https://pharmacopoeia.ru/fs-2-5-0033-15-polyni-gorkoj-trava/> (дата обращения: 10.10.2021).

12. Скрыпник Л., Новикова А. Моделирование и оптимизация процесса получения обогащенных антиоксидантами экстрактов из отходов переработки яблок на основе неионогенных эмульгаторов // Актуальная биотехнология. 2020. №3. С. 634–637.

13. 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.

14. Syklovska-Baranek K., Pietrosiuk A., Kokoszka A., Furmanowa M. Enhancement of taxane production in hairy root culture of *Taxus x media* var. *Hicksii* // Journal of plant physiology. 2009. Vol. 166, №17. P. 1950–1954.

15. Murakami Y., Omoto T., Asai I. et al. Rosmarinic acid and related phenolics in transformed root cultures of *Hyssopus officinalis* // Plant cell, tissue and organ culture. 1998. Vol. 53, №1. P. 75–78.

16. Soheilikhah Z., Modarresi M., Karimi N., Movafeghi A. Qualitative and quantitative analysis of diosmin content of hyssop (*Hyssopus officinalis*) in response to salinity stress // Heliyon. 2021. Vol. 7, №10. P. e08228.

17. Sharifi-Rad J., Quispe C., Kumar M. et al. Hyssopus Essential Oil: An Update of Its Phytochemistry, Biological Activities, and Safety Profile // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2022. Vol. 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/8442734>.

Об авторах

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

E-mail: APungin@kantiana.ru

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

E-mail: elena_popova97@mail.ru

Лидия Олеговна Ларцева — студ., Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Россия.

E-mail: lida.lartseva@mail.ru



The authors

Dr Artyom V. Pungin, Associate Professor, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia.

E-mail: APungin@kantiana.ru

Elena A. Popova, Master's Student, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia.

E-mail: elena_popova97@mail.ru

Lidiya O. Larceva, Student, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia.

E-mail: lida.lartseva@mail.ru