ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2534
https://elibrary.ru/OOVUEP

Оригинальная статья
https://fptt.ru

Оценка содержания вторичных метаболитов и антиоксидантной активности экстрактов каллусных культур и микрорастений *in vitro Hyssopus officinalis* L.

Е. А. Попова*, А. В. Пунгин, А. П. Пантюхина, О. В. Кроль

Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия

Поступила в редакцию: 08.04.2024
Принята после рецензирования: 13.05.2024
Принята к публикации: 04.06.2024

**Е. А. Попова: elena_popova97@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-7008-3823*
А. В. Пунгин: https://orcid.org/0000-0001-8374-3907
А. П. Пантюхина: https://orcid.org/0009-0009-5907-290X
О. В. Кроль: https://orcid.org/0000-0001-8030-3068

© Е. А. Попова, А. В. Пунгин, А. П. Пантюхина, О. В. Кроль, 2024

Аннотация.
Hyssopus officinalis L. – ценное лекарственное растение, экстракты которого обладают рядом биологически активных эффектов и перспективны для использования в различных отраслях промышленности. Актуальным является использование биотехнологических методов получения важных вторичных метаболитов, например с применением каллусных культур. Важным вопросом остается соответствие культур по качественному и количественному содержанию целевых веществ. Целью данного исследования являлась сравнительная оценка накопления вторичных метаболитов фенольной природы, антиоксидантной и антимикробной активности экстрактов трех каллусных культур, нативных растений, микрорастений *in vitro* и коммерческого препарата *H. officinalis*.
Экстракты исследуемых объектов были получены с использованием 70 % этанола. Содержание фенольных соединений, флавоноидов, гидроксикоричных кислот, танинов определяли по стандартным методикам. Определение содержания отдельных фенольных соединений проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Антиоксидантную активность определяли с использованием трех методов (DPPH, FRAP и ABTS). Оценку антимикробной и фунгицидной активности проводили диско-диффузионным методом.
Высокий индекс роста сырой биомассы каллусов (11,6 ± 1,4) наблюдали на среде Мурасиге-Скуга с добавлением 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина и 1 мг/л 2,4-Д (MS-6). Культура MS-6, по сравнению с остальными исследуемыми объектами, отличалась высоким содержанием фенольных соединений (35,5 ± 1,2 мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы), гидроксикоричных кислот (82,5 ± 2,6 мг-экв. розмариновой кислоты/г сухой массы), танинов (49,6 ± 0,8 мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы), розмариновой (20,25 ± 1,84 мг/г сухой массы) и кофейной (1,48 ± 0,08 мг/г сухой массы) кислот. Экстракты данной культуры показали значительную антиоксидантную активность согласно методу DPPH (127,8 ± 5,6 мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой массы) и FRAP (15,9 ± 1,3 мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой массы), а также слабую антибактериальную и фунгицидную активность при концентрации экстракта 2 мг/диск в отношении *Bacillus subtilis* (7,2 ± 0,2 мм), *Candida albicans* (7,0 ± 0,2 мм) и при концентрации экстракта 1 мг/диск (7,0 ± 0,3 мм) и 2 мг/диск (7,3 ± 0,1 мм) в отношении *Escherichia coli*.
Исследуемые экстракты каллусных культур *H. officinalis* и микрорастений *in vitro* в сравнении с экстрактом нативного растения показали наилучший выход вторичных метаболитов, что доказывает перспективность применения биотехнологического метода получения из клеточных культур ценных соединений.

Ключевые слова. Каллус, фенольные соединения, флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, танины, антиоксидантная активность, антимикробная активность

Для цитирования: Оценка содержания вторичных метаболитов и антиоксидантной активности экстрактов каллусных культур и микрорастений *in vitro Hyssopus officinalis* L. / Е. А. Попова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 658–674. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2534

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2534
https://elibrary.ru/OOVUEP

Original article
Available online at https://fptt.ru/en

Evaluating Secondary Metabolites and Antioxidant Activity of *in vitro* Callus and Micro-Plant Extracts of *Hyssopus officinalis* L.

Elena A. Popova*, Artem V. Pungin, Anastasia P. Pantyukhina, Olesya V. Krol

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

Received: 08.04.2024
Revised: 13.05.2024
Accepted: 04.06.2024

**Elena A. Popova: elena_popova97@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-7008-3823*
Artem V. Pungin: https://orcid.org/0000-0001-8374-3907
Anastasia P. Pantyuhina: https://orcid.org/0009-0009-5907-290X
Olesya V. Krol: https://orcid.org/0000-0001-8030-3068

© E.A. Popova, A.V. Pungin, A.P. Pantyukhina, O.V. Krol, 2024

Abstract.
Hyssopus officinalis L. is a valuable medicinal plant. Its extracts have good commercial prospects as biologically active substances. Biotechnological production methods that yield valuable secondary metabolites often involve callus cultures, which differ in qualitative and quantitative content of target substances. This research compared phenolic secondary metabolites, antioxidants, and antimicrobial activities in extracts of three callus cultures *in vitro*, native plants, micro-plants and a commercial preparation of *H. officinalis*.
The extracts were obtained using 70% ethanol. The content of phenolic compounds, flavonoids, hydroxycinnamic acids, and tannins was determined by standard methods. The method of high-performance liquid chromatography revealed the content of individual phenolic compounds. The antioxidant activity tests relied on DPPH, FRAP, and ABTS. The antimicrobial and fungicidal activity was assessed by the disc-diffusion method.
The Murashige-Skoog medium with 0.2 mg/L 6-benzylaminopurine and 1 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid demonstrated a high growth index of callus crude biomass (11.6 ± 1.4). The same culture was rich in phenolic compounds (35.5 ± 1.2 mg-eq. gallic acid/g solids), hydroxycinnamic acids (82.5 ± 2.6 mg-eq. rosmarinic acid/g solids), tannins (49.6 ± 0.8 mg-eq. gallic acid/g solids), rosmarinic acid (20.25 ± 1.84 mg/g solids), and caffeic acid (1.48 ± 0.08 mg/g solids). Its extracts showed significant antioxidant activity according to DPPH (127.8 ± 5.6 mg-eq. ascorbic acid/g solids) and FRAP (15.9 ± 1.3 mg-eq. ascorbic acid/g solids). However, they had a rather weak antibacterial and fungicidal activity against *Bacillus subtilis* (7.2 ± 0.2 mm) and *Candida albicans* (7.0 ± 0.2 mm) at a concentration of 2 mg/disk. The antibacterial and fungicidal activity against *Escherichia coli* was equally weak at 1 mg/disk (7.0 ± 0.3 mm) and 2 mg/disk (7.3 ± 0.1 mm), respectively.
The extracts of *H. officinalis* callus cultures and micro-plants in vitro produced the best yield of secondary metabolites compared to the native plant extract. Biotechnological methods proved effective in obtaining valuable compounds from cell cultures.

Keywords. Callus, phenolic compounds, flavonoids, hydroxycinnamic acids, tannins, antioxidant activity, antimicrobial activity

For citation: Popova EA, Pungin AV, Pantyukhina AP, Krol OV. Evaluating Secondary Metabolites and Antioxidant Activity of *in vitro* Callus and Micro-Plant Extracts of *Hyssopus officinalis* L. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4): 658–674. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2534

Введение

Иссоп лекарственный (*Hyssopus officinalis* L.) – полукустарник, относящийся к семейству яснотковые (*Lamiaceae* Lindl.). Центр формирования *H. officinalis* связан с областью Древнего Средиземноморья и имеет достаточно обширный ареал [1]. *H. officinalis* использовали как лечебное и кулинарное растение. Данный вид является фармокопейным в таких странах как Франция, Португалия и Румыния [2]. Основными фитокомпонентами *H. officinalis* являются флавоноиды (апигенин, диосмин, кверцентин, лютеолин и их производные), дубильные вещества, фенольные и гидроксикоричные кислоты, эфирное масло [1, 3, 4]. Растение обладает антиоксидантным, антибактериальным, противовирусным, спазмолитическим, противовоспалительным и цитотоксическим действием [2, 4, 5].

Все вышеперечисленное делает *H. officinalis* перспективным растением для получения важных биологически активных веществ. Важно понимать, что их получение из нативного растения имеет ряд ограничений,

таких как сезонность, ареал произрастания, требования к почвенным условиям и другие [6]. Поэтому биотехнологические методы получения вторичных метаболитов из растений являются очень перспективными в дополнение к производству, осуществляемому классическими методами растениеводства. Методы культивирования тканей растений, например каллусных культур, в некоторых случаях обеспечивают скорость производства вторичных метаболитов в более высоких количествах, исключая ингибирующее воздействие факторов окружающей среды [7, 8].

Для успешной индукции каллуса очень важны такие факторы, как питательная среда, регуляторы роста, типы эксплантов и условия культивирования [9]. В литературе имеются данные влияния типов эксплантов, регуляторов роста и элиситоров на индукцию образования каллусной культуры *H. officinalis* [10–13]. К настоящему моменту для получения каллуса в качестве эксплантов использовали листья, гипокотили и корни трехнедельных проростков *H. officinalis* [10, 12]. Наибольшую способность к индукции каллуса показали культивированные *in vitro* экспланты гипокотилей, за которыми следуют корни и листья [10].

Предыдущие исследования по влиянию регуляторов роста на каллусогенез *H. officinalis* показали, что наибольшая частота образования каллуса была получена на двух средах Мурасиге-Скуга (MS): содержащей 2 мг/л 6-бензиламинопурина с добавлением 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и содержащей 2 мг/л 6-бензиламинопурина с добавлением 1 или 2 мг/л α-нафтилуксусной кислоты [10, 11, 14]. В другом исследовании сообщалось, что оптимальной питательной средой для индукции каллусогенеза была среда MS с 1 мг/л индолил-3-масляной кислоты и среда с 0,5 мг/л α-нафтилуксусной кислоты, 0,1 мг/л кинетина и 1 мг/л 6-бензиламинопурина [12]. Были получены данные о значительном влиянии на каллусогенез эксплантатов листьев и черешков различных концентраций нитропруссида натрия и 2,4-Д. Концентрации нитропруссида натрия 20 мкм индуцировали каллусогенез до 72 %, но в сочетании с концентрациями 2,4-Д каллогенез увеличивался до 100 %. В отсутствие нитропруссида натрия каллусы не образовывались. Наблюдали значительное влияние 2,4-Д и нитропруссида натрия на увеличение массы свежего каллуса [15].

Клеточные культуры *H. officinalis*, полученные из гипокотиля, продуцируют два стерола (β-ситостерол и стигмастерол) и несколько известных тритерпенов, например олеаноловую и урсоловую кислоты [13]. В нашем предыдущем исследовании была проведена оценка условий культивирования каллусных культур *H. officinalis* в отношении выхода полифенольных соединений [16]. Было обнаружено, что среда Мурасиге-Скуга, дополненная 2 мг/л кинетина в сочетании с 3 мг/л α-нафтилуксусной кислоты, приводила к наибольшему выходу вторичных метаболитов, в частности флавоноидов и полифенольных соединений, повышению антиоксидантной активности экстрактов.

При использовании методов культуры тканей растений с целью биосинтеза вторичных метаболитов, немаловажным является соответствие полученного продукта по качественному и количественному содержанию биологически активных веществ, сопоставимых с растительным сырьем, получаемым традиционным способом. Имеющиеся в литературе данные недостаточно раскрывают потенциал каллусных культур *H. officinalis* в продукции важных биологически активных веществ.

Цель настоящего исследования заключалась в сравнительной оценке накопления вторичных метаболитов фенольной природы, антиоксидантной и антимикробной активности экстрактов трех каллусных культур, нативных растений, микрорастений *in vitro* и коммерческого растительного препарата *H. officinalis*.

Объекты и методы исследования

Для получения каллуса и культуры растений *in vitro* использовали асептические проростки *Hyssopus officinalis,* которые были получены из семян фирмы «Гавриш» сорта «Лекарь». Для получения каллусных культур листовые экспланты помещали в чашки Петри на питательную среду Мурасиге-Скуга с добавлением сахарозы (в объеме 3 %) и агара (в объеме 0,7 %), pH питательной среды 5,6–5,8 [14]. Для индукции каллусогенеза и последующего культивирования использовали три варианта модифицированной среды MS: MS-2 с добавлением 2 мг/л кинетина и 3 мг/л 1-нафталинуксусной кислоты; MS-5 с добавлением 0,8 мг/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1,5 мг/л 3-индолилуксусной кислоты и 0,5 мг/л индолил-3-масляной кислоты; MS-6 с добавлением 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина и 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. Культивирование проводили в условиях термостата при 25 ºС в течение 4 недель. Субкультивирование на свежую питательную среду осуществляли каждые 4 недели.

Для изучения содержания биологически активных веществ в культурах растений *in vitro* асептические проростки *H. officinalis* помещали в емкость для культивирования растений Phytohealth (SPL Lifesciences, Naechon-Myeon, Республика Корея) на среду MS, дополненную сахарозой (в объеме 3 % от количества питательной среды) и агаром (в объеме 0,7 % от количества питательной среды), без добавления регуляторов роста, pH среды 5,6–5,8. Клональное микроразмножение осуществляли методом черенкования придаточных побегов каждые 4 недели. Культуры выдерживали в комнате для выращивания при температуре 25 ± 2 °С с использованием 16-часового фотопериода (белые светодиодные лампы; плотность потока фотосинтетических фотонов 160 мкмоль/м^2·с).

Нативные растения *H. officinalis* сорта «Лекарь» выращивались в 2022–2023 гг. на экспериментальном

участке на территории ботанического сада Балтийского федерального университета имени Иммануила Канта (Калининград, Россия). Для эксперимента в период цветения (август 2023 г.) была собрана надземная часть двулетних растений (соцветия, листья и стебли).

Коммерческий растительный препарат фиточай фирмы «Травы Горного Крыма», содержащий надземные части *Hyssopus officinalis*, выступал в нашем исследовании в качестве примера, как растительное сырье, получаемое традиционным способом.

Для оценки ростовых характеристик каллусных культур в условиях ламинар-бокса отбирали 0,250 г сырой биомассы каллусной культуры (с точностью до 0,001 г) и переносили на свежую питательную среду соответствующего состава (n = 5). Далее прирост сырой и сухой биомассы (с точностью до 0,001 г) измеряли каждые 5 дней на протяжении 50 дней. Для определения сухой биомассы каллусы сушили до постоянной массы при температуре 60 °С. Индекс роста рассчитывали как отношение разницы массы каллуса в начале и конце цикла выращивания к начальной массе каллуса [17].

Для приготовления экстрактов сухой растительный материал измельчали до размера частиц менее 0,5 мм. Навеску растительного сырья массой 0,5 г мацерировали в 45 мл 70 % раствора этанола при комнатной температуре в течение 24 ч. После экстракты центрифугировали в течение 30 мин при 3900 g на центрифуге Eppendorf 5810R. Далее супернатант переливали в мерную колбу на 50 мл и доводили объем 70 % этанолом до метки.

Общее содержание фенольных соединений определяли с помощью реактива Фолина-Чокалтеу [18]. Для этого к 100 мкл исследуемого экстракта добавляли 300 мкл реактива Фолина-Чокалтеу, 3 мл 11,5 % раствора карбоната натрия, 2,6 мл дистиллированной воды и перемешивали. Спустя 20 мин измеряли поглощение растворов при длине волны 720 нм на спектрофотометре UV-3600 (Shimadzu, Япония). В качестве раствора сравнения использовали дистиллированную воду. Галловую кислоту использовали в качестве калибровочного стандарта. Общее содержание фенольных соединений определяли по градуировочному графику и выражали в мг – эквивалентах галловой кислоты на грамм сухой массы (мг-экв. галловой кислоты/г СМ) (табл. 1).

Суммарное содержание флавоноидов определяли на основе реакции комплексообразования с хлоридом аллюминия спектрофотометрическим методом [19]. С этой целью к 1 мл исследуемого экстракта добавляли 2 мл 2 % раствора хлорида алюминия в 95 % этаноле, 1 каплю разведенной уксусной кислоты и доводили объем раствора до 10 мл 95 % этанолом. Для каждого экстракта готовили раствор сравнения без добавления 2 % раствора хлорида алюминия. Поглощение растворов измеряли по истечению 30 мин при 410 нм на спектрофотометре UV-3600 (Shimadzu, Япония). Рутин использовали в качестве калибровочного стандарта. Общее содержание флавоноидов определяли по градуировочному графику и выражали в мг-экв. рутина на грамм сухой массы (мг-экв. рутина/г сухой массы) (табл. 1).

Общее содержание гидроксикоричных кислот проводили с использованием реактива Арно [20, 21]. Для этого к 1 мл растительного экстракта добавляли 2 мл 0,5 М HCl, 2 мл реагента Арно и 2 мл 8,5 % NaOH. 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 UV-3600 (Shimadzu, Япония). Для построения калибровочного графика использовали розмариновую кислоту. Суммарное содержание гидроксикоричных кислот определяли по градуировочному графику и выражали в мг-экв. розмариновой кислоты на грамм сухой массы (мг-экв. розмариновой кислоты/г сухой массы) (табл. 1).

Суммарное содержание танинов определяли с использованием реакции образования окрашенного в синий цвет раствора берлинской лазури спектрофотометрическим методом [22]. Определение проходило в два этапа. На первом этапе осуществляли определение суммарного содержания всех полифенолов. Для этой цели в колбы на 50 мл добавляли 25 мл бидистиллированной воды, 250 мкл растительного экстракта, 3 мл $FeCl_3$, затем перемешивали. В качестве контроля использовали бидистиллированную воду. Через 3 мин добавляли

Таблица 1. Градуировочные кривые уравнений стандартов фенольных соединений

Table 1. Calibration curves for phenolic compound standards

Метод исследования	Стандарт	Диапазон, мг/мл	Уравнение	R^2
Содержание фенольных соединений	галловая кислота	0,01–0,20	$y = 1{,}293x + 0{,}004$	0,999
Содержание флавоноидов	рутин	0,01–0,15	$y = 3{,}328x + 0{,}007$	0,998
Содержание танинов	галловая кислота	0,01–0,80	$y = 2{,}9824x + 0{,}0093$	0,996
Содержание гидроксикоричных кислот	розмариновая кислота	0,01–0,40	$y = 1{,}967x + 0{,}032$	0,998
Антиоксидантная активность (DPPH)	аскорбиновая кислота	0,01–0,15	$y = 6{,}708x + 0{,}038$	0,996
Антиоксидантная активность (ABTS)	аскорбиновая кислота	0,001–0,075	$y = 9{,}060x + 0{,}008$	0,999
Антиоксидантная активность (FRAP)	аскорбиновая кислота	0,01–0,15	$y = 15{,}973x - 0{,}079$	0,997

3 мл раствора $K_3Fe(CN)_6$, перемешивали и через 10 мин снимали показания оптической плотности растворов на спектрофотометре UV-3600 (Shimadzu, Япония) при длине волны 720 нм. На втором этапе проводили определение остаточных полифенолов путем проведения осаждения танинов желатином и коалином. Для этого к 10 мл экстракта добавляли 5 мл раствора желатина (1 % раствор желатина в 10 % растворе NaCl), 2 г каолина, перемешивали в течение 5 мин. Далее смесь отфильтровали, а с фильтратом проводили те же манипуляции, описанные для первого этапа. Суммарное содержание танинов определяли как разность между суммарным содержанием полифенолов и остаточным содержанием полифенолов. Для построения каллибровочного графика в качестве стандарта использовали галловую кислоту. Общее содержание танинов определяли по градуировочному графику и выражали в мг-экв. галловой кислоты на грамм сухой массы (мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы) (табл. 1).

Для определения содержания отдельных фенольных соединений в экстрактах использовали методы высокоэффективной жидкостной хроматографии [23, 24]. Экстракты, приготовленные как описано выше, фильтровали и концентрировали на вакуумном центробежном испарителе Concentrator plus (Eppendorf, Германия). Полученное сухое вещество растворяли в 10 % растворе метанола. Новый экстракт 20 мин центрифугировали (4500×g) и надосадочную жидкость фильтровали через шприцевой фильтр (0,22 мкм). Анализ проводили на хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence с диодно-матричным детектором Shimadzu SPD20MA и колонкой Phenomenex Luna (C18 250×4,6 мм, 5 мкм). Подвижная фаза представляла собой смесь растворителей вода/трифторуксусная кислота 99,9/0,1 (растворитель А) и ацетонитрил (растворитель Б). Для разделения веществ использовали градиентный режим, скорость потока 1,0 мл/мин, температуру колонки 40 °C и объем пробы 10 мкл. Детектирование осуществляли в диапазоне длин волн 180–900 нм. Идентификацию соединений проводили в программе LabSolutions путем сравнения времен удерживания пиков и УФ-спектров, полученных на хроматограммах, с соответствующими параметрами хроматографически чистых стандартов образцов. Количественный анализ изученных флавоноидов проводили по градуировочным графикам, построенным в диапазоне концентраций 10–100 мкг/мл. Использовали следующие стандарты Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Rus, Москва, Россия): кофейная кислота, кафтаровая кислота, цикориевая кислота, розмариновая кислота, 7-О-глюкозид апигенина и 7-О-глюкозид лютеолина.

Антиоксидантную активность оценивали по методу DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил), FRAP (Fe(III)-2,4,6-три(2-пиридил)-s-триазин комплекс) и ABTS (2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты)) [23]. В качестве стандарта использовали растворы аскорбиновой кислоты известной концентрации (табл. 1). Результаты анализа выражаются в мг-экв. аскорбиновой кислоты на грамм сухой массы (мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой массы).

Для анализа методом DPPH брали 10, 20, 30 мкл экстракта и добавляли 2,85 мл раствора DPPH. Объем доводили до 3,10 мл этиловым спиртом. В качестве раствора сравнения вместо экстракта использовали смесь, содержащую раствор DPPH и 70 % этанол. Растворы оставляли на 60 мин в темном месте. После чего измеряли снижение поглощения при 515 нм на спектрофотометре UV-3600 (Shimadzu, Япония).

При определении антиоксидантной активности ABTS предварительно готовили раствор радикала ABTS. Радикал ABTS получали путем смешивания аликвот 7,0 мМ раствора ABTS и 2,45 мМ раствора персульфата калия. Полученный раствор выдерживали в течение 16 ч в темноте при комнатной температуре. Для проведения реакции в каждую лунку микропланшета добавляли 300 мкл приготовленного раствора катионного радикала ABTS и 20 мкл экстракта или стандарта. Полученную смесь инкубировали в течение 15 мин при 37 °C в темноте и измеряли оптическое поглощение при длине волны 734 нм (CLARIOstar, BMG Labtech, Германия).

Для определения восстановительной способности экстрактов использовали свежеприготовленный реагент FRAP. Реагент FRAP получали путем смешивания 10 частей 0,3 М ацетатного буфера (pH 3,6), 1 части 10 мМ раствора 2,4,6-трипиридил-s-триазина в 40 мМ HCl и 1 части 20 мМ водного раствора хлорида железа $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. Для проведения реакции в каждую лунку микропланшета добавляли 300 мкл реагента FRAP и 20 мл исследуемого экстракта или стандартного раствора. Полученную смесь выдерживали в течение 10 мин при 37 °C в темноте; оптическое поглощение измеряли при длине волны 593 нм (CLARIOstar, BMG Labtech, Германия).

Оценку антимикробной и фунгицидной активности проводили диско-диффузионным методом [25]. Для тестирования растительных экстрактов использовали бактерии вида *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, а также грибок *Candida albicans*. Для культивирования микроорганизмов была приготовлена среда Луриа-Бертани [26]. Питательная среда готовилась в дистиллированной воде и автоклавировалась при 121 ºC в течение 20 мин. Диски получали с использованием дырокола и фильтровальной бумаги, стерилизовали путем автоклавирования при 121 °C в течение 20 мин. Затем их пропитывали исследуемыми экстрактами. Экстракты тестируемых образцов фильтровали и сушили, а полученное сухое вещество растворяли в 10 % растворе диметилсульфоксида. Для каждого экстракта были подготовлены диски с конечной концентрацией 0,25, 0,5, 1 и 2 мг/диск. В качестве положительного контроля использовали стандартные диски с антибиотиком (канамицин), в качестве отрицательного контроля – диск, пропитанный 10 % раствором диметилсульфоксида. Подготовленная

суспензия микроорганизмов с оптической плотностью 0,5 по стандарту McFarland равномерно распределялась по поверхности среды с помощью стерильного шпателя Дригальского [25]. Через 15 мин после инокуляции на поверхность питательной среды нанесли ранее подготовленные диски. Через 15 мин чашки Петри помещали в термостат кверху дном и инкубировали при температуре 35 °C в течение 6 ч. После окончания инкубации проводили измерение зон подавления роста вокруг дисков.

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили 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 однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки HSD ($p \leq 0{,}05$). Статистические результаты представлены в виде среднего значения ± стандартного отклонения. Для оценки корреляции количественных признаков использовали коэффициент корреляции Пирсона ($p \leq 0{,}05$).

Результаты и их обсуждение

На модифицированной среде MS были получены три каллусные культуры, инициированные из листовых эксплантов *Hyssopus officinalis* сорта «Лекарь»: MS-2 с добавлением 2 мг/л кинетина и 3 мг/л *α*-нафтилуксусной кислоты (рис. 1a); MS-5 с добавлением 0,8 мг/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1,5 мг/л 3-индолилуксусной кислоты и 0,5 мг/л индолил-3-масляной кислоты (рис. 1b); MS-6 с добавлением 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина и 1 мг/л 2,4-Д (рис. 1c). Каллус, культивируемый на питательной среде MS-2 и MS-6 имел зеленовато-белый цвет и рыхлую консистенцию. Каллус на среде MS-5 был коричнево-зеленого цвета и имел рыхлую консистенцию. Геммогенез и ризогенез отсутствовали на всех трех каллусных культурах.

На основе индекса роста сырой и сухой биомассы были построены кривые роста каллусных культур *H. officinalis* (рис. 2). Максимальный индекс роста сырой биомассы (11,6 ± 1,4) на среде MS-6 с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д наблюдали на 35 день. На среде MS-5 с добавлением 0,8 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1,5 мл/л 3-индолилуксусной кислоты и 0,5 мл/л индолил-3-масляной кислоты максимальный индекс сырой биомассы (10,1 ± 1,1) наблюдали на 40 день (рис. 2a).

Максимальный индекс роста сухой биомассы исследуемых каллусных культур (10,6 ± 1,0) зафиксировали на 40 день на среде MS-2 с добавлением 2 мл/л кинетина в сочетании с 3 мл/л *α*-нафтилуксусной кислоты. Для каллусных культур, культивируемых на среде MS-6 с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д и на среде MS-5 с добавлением 0,8 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1,5 мл/л 3-индолилуксусной кислоты и 0,5 мл/л индолил-3-масляной кислоты, максимальный индекс роста установлен на 35 день культивирования – 8,7 ± 0,7 и 6,1 ± 0,6 соответственно (рис. 2b).

Высокий рост сырой биомассы каллусов наблюдали на среде MS с добавлением 2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д (MS-6) на 35 день культивирования (ANOVA $F = 4{,}7$; $p \leq 0{,}05$). Наибольший индекс роста сухой биомассы каллусов зафиксировали на среде MS с добавлением 2 мл/л кинетина в сочетании с 3 мл/л *α*-нафтилуксусной кислоты (MS-2) на 40 день культивирования (ANOVA $F = 37{,}5$; $p \leq 0{,}001$). Ранее в исследованиях было показано [10, 11], что наилучший рост каллусной культуры *H. officinalis* наблюдали на среде MS, содержащей 2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д и 2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 или 2 мл/л *α*-нафтилуксусной кислоты. Оптимальными питательными средами для индукции каллусогенеза были

a b c

Рисунок 1. Каллусные культуры *Hyssopus officinalis* L., культивируемые на питательной среде Мурасиге-Скуга с добавлением регуляторов роста: a – MS-2 (2 мл/л кинетина в сочетании с 3 мл/л α-нафтилуксусной кислоты); b – MS-5 (0,8 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1,5 мл/л 3-индолилуксусной кислоты и 0,5 мл/л индолил-3-масляной кислоты); c – MS-6 (0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д)

Figure 1. Callus cultures of *Hyssopus officinalis* L. grown on Murashige-Skoog medium with the following growth regu lators: a – MS-2 (2 ml/L kinetin and 3 mL/L α-naphthylacetic acid); b – MS-5 (0.8 mL/L 6-benzylaminopurine w ith 1.5 mL/L 3-indoleacetic acid and 0.5 mL/L indole-3-butyric acid); c – MS-6 (0.2 mL/L 6-benzy laminopurine and 1 mL/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid)

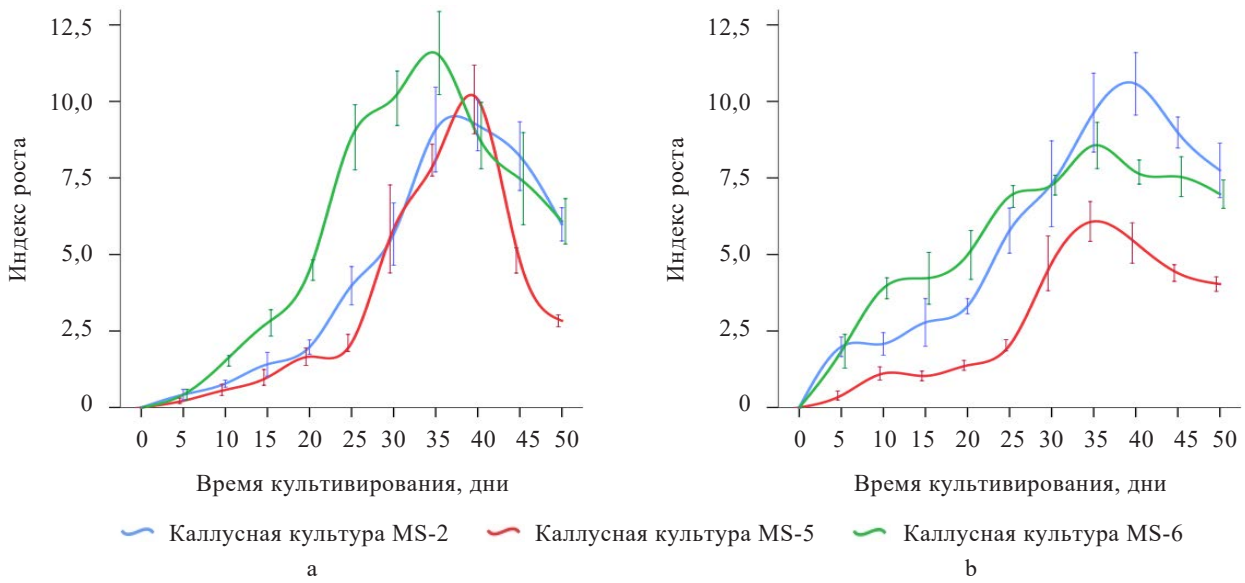

Рисунок 2. Кривые роста каллусных культур *Hyssopus officinalis* L. на основании прироста сырой (a) и сухой (b) биомассы: MS-2 – 2 мл/л кинетина в сочетании с 3 мл/л *α*-нафтилуксусной кислоты; MS-5 – 0,8 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1,5 мл/л 3-индолилуксусной кислоты и 0,5 мл/л индолил-3-масляной кислоты; MS-6 – 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д

Figure 2. Growth curves for *Hyssopus officinalis* L. callus cultures based on the increase in raw (a) and dry (b) biomass: MS-2 – 2 mL/L kinetin and 3 mL/L *α*-naphthylacetic acid; MS-5 – 0.8 mL/L 6-benzylaminopurine with 1.5 mL/L 3-indoleacetic acid and 0.5 mL/L indole-3-butyric acid; MS-6 – 0.2 mL/L 6-benzylaminopurine and 1 mL/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

среда MSc добавлением 1 мг/л индолил-3-масляной кислоты и среда, содержащая 0,5 мг/л *α*-нафтилуксусной кислоты, 0,1 мг/л кинетина и 1 мг/л 6-бензиламинопурина [12]. Можно сделать вывод, что рост каллусной культуры *H. officinalis* наиболее эффективен с добавлением в среду таких регуляторов роста, как 6-бензиламинопурин, 2,4-Д и *α*-нафтилуксусная кислота.

Фенольные соединения и флавоноиды являются антиоксидантами, считаются перспективными антибиотическими и противогрибковыми средствами [27, 28, 29]. Среди фенольных соединений *H. officinalis* преобладают гидроксикоричные кислоты, содержание которых составляет 72,5 % от суммы фенольных соединений [1]. Фенольные соединения включают в себя танины [30, 31]. В данном исследовании мы сравнивали суммарное содержание фенольных соединений, флавоноидов, танинов и гидроксикоричных кислот в изучаемых каллусных культурах, в культурах микрорастений *in vitro*, в коммерческом препарате и в нативном растении *H. officinalis*.

Выявили различия в содержании фенольных соединений (ANOVA, $F = 96{,}7$; $p \leq 0{,}001$). Высокое содержание фенольных соединений отмечали в каллусной культуре *H. officinalis,* полученной на среде MS-6 с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д (35,5 ± 1,2 мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы), что примерно в 1,5 раза больше, чем в нативном растении. Наименьшее содержание фенольных соединений зафиксировали в культурах растений *in vitro* (8,5 ± 3,9 мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы) (рис. 3).

Анализ общего содержания флавоноидов в исследуемом растительном материале *H. officinalis* показал статистически значимые различия (ANOVA, $F = 105{,}4$; $p \leq 0{,}001$) (рис. 4). Наибольшее содержание флавоноидов обнаружили в культурах растений *H. officinalis* выращиваемых *in vitro* на питательной среде MS без использования регуляторов роста (5,6 ± 0,8 мг-экв. рутина/г сухой массы). В каллусных культурах, нативном растении и коммерческом продукте содержание флавоноидов в 4–7 раз ниже по сравнению с растениями, выращиваемыми *in vitro*. В другом исследовании количественное содержание флавоноидов в нативном растении было определено как 1,300 ± 0,001 мг/г, что сопоставимо с их содержанием в нашем экстракте коммерческого препарата (1,3 ± 0,5 мг-экв. рутина/г сухой массы), выше, чем в каллусных культурах, а также ниже, чем в экстракте растения *H. officinalis*, культивируемого *in vitro* (2,9 ± 2,7 мг-экв. рутина/г сухой массы) [1].

Анализ суммы гидроксикоричных кислот показал статистически значимые различия (ANOVA, $F = 1547$; $p \leq 0{,}001$). Наибольшее содержание гидроксикоричных кислот зафиксировали в экстракте каллусной культуры *H. officinalis* на среде MS-6 с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д (82,5 ± 2,6 мг-экв. розмариновой кислоты/г сухой массы). Низкое содержание гидроксикоричных кислот

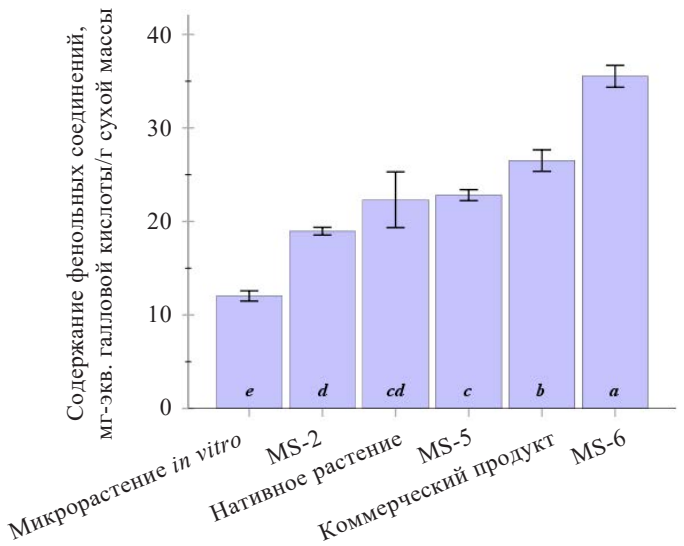

Рисунок 3. Общее содержание фенольных соединений в исследуемом растительном материале *Hyssopus officinalis* L.
Примечание: разные буквы указывают на статистически значимые различия
(ANOVA с апостериорным критерием Тьюки, $p \leq 0{,}001$)

Figure 3. Total phenols in various *Hyssopus officinalis* materials L. Different letters indicate statistically significant differences
(ANOVA with the Tukey's HSD *post hoc* test, $p \leq 0.001$)

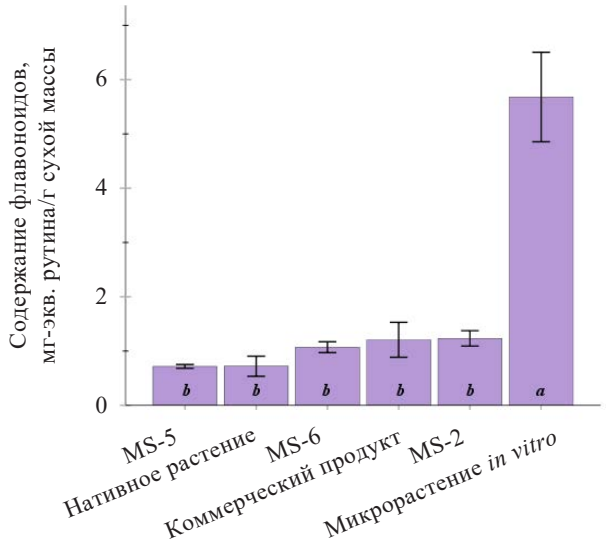

Рисунок 4. Общее содержание флавоноидов в исследуемом растительном материале *Hyssopus officinalis* L.
Примечание: разные буквы указывают на статистически значимые различия
(ANOVA с апостериорным критерием Тьюки, $p \leq 0{,}001$)

Figure 4. Total flavonoids in various *Hyssopus officinalis* L. materials. Different letters indicate statistically significant differences
(ANOVA with the Tukey's HSD *post hoc* test, $p \leq 0.001$)

выявили для микрорастений, культивируемых на среде MS без добавления регуляторов роста (26,7 ± 0,9 мг-экв. розмариновой кислоты/г сухой массы) и для нативного растения *H. officinalis* (24,1 ± 0,9 мг-экв. розмариновой кислоты/г сухой массы) (рис. 5).

Результаты исследования общего содержания танинов в экстрактах *H. officinalis* показали значимые различия (ANOVA, $F = 956$; $p \leq 0{,}001$). Наибольшее содержание танинов зафиксировали в каллусной культуре *H. officinalis*, культивируемой на среде MS-6 с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д (49,6 ± 0,8 мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы). Наименьшее содержание танинов наблюдали в каллусной культуре MS-2 с добавлением 2 мл/л кинетина в сочетании с 3 мл/л α-нафтилуксусной кислотой (20,3 ± 0,6 мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы) и в растении *in vitro* (20,1 ± 0,5 мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы) (рис. 6).

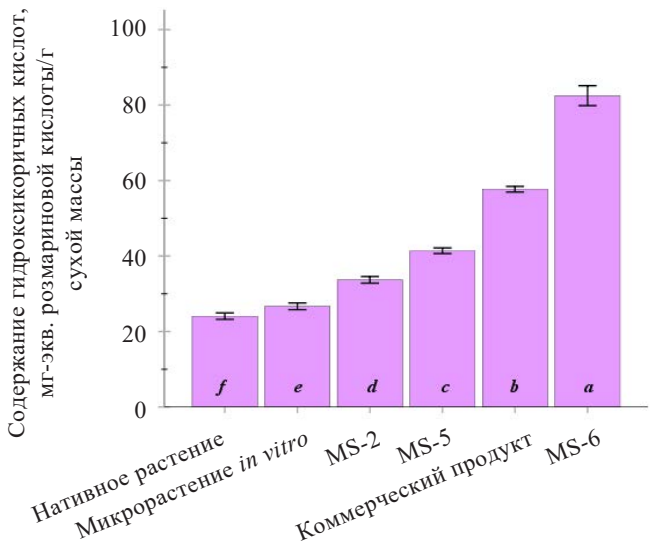

Рисунок 5. Общее содержание гидроксикоричных кислот в исследованном растительном материале *Hyssopus officinalis* L.
Примечание: разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA с апостериорным критерием Тьюки, $p \leq 0{,}001$)

Figure 5. Total hydroxycinnamic acids in various *Hyssopus officinalis* L. materials. Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA with the Tukey's HSD *post hoc* test, $p \leq 0.001$)

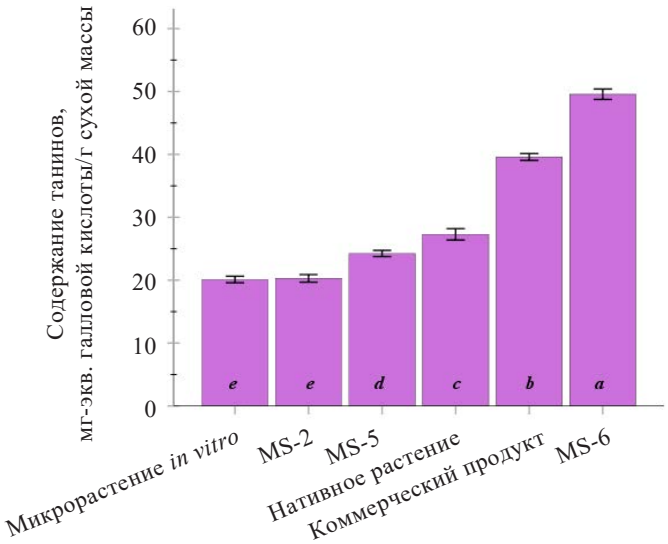

Рисунок 6. Общее содержание танина в исследуемом растительном материале *Hyssopus officinalis* L.
Примечание: разные буквы указывают на статстически значимые различия (ANOVA с апостериорным критерием Тьюки, $p \leq 0{,}001$)

Figure 6. Total tannins in various Hyssopus *officinalis* L. materials. Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA with the Tukey's HSD *post hoc* test, $p \leq 0.001$)

Анализ исследуемых экстрактов *H. officinalis* на содержание отдельных фенольных соединений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии показал наличие розмариновой, кафтаровой, кофейной и цикориевой кислот (табл. 2). Экстракты растения, культивируемого *in vitro* на среде MS без регуляторов роста, содержали флавоны: цинарозид (1,20 ± 0,36 мг/г сухой массы) и космосиин (0,48 ± 0,05 мг/г сухой массы).

Высокое содержание (ANOVA, $F = 310$; $p \leq 0{,}001$) кофейной кислоты (1,48 ± 0,08 мг/г сухой массы) отмечали в каллусной культуре MS-6, культивируемой на среде MS с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д, и в микрорастении

Таблица 2. Содержание отдельных фенольных кислот и флавоноидов в исследуемом растительном материале *Hyssopus officinalis* L. (n = 3)

Table 2. Phenolic acids and flavonoids in various *Hyssopus officinalis* L. materials. (n = 3)

Растительный материал	Содержание отдельных фенольных соединений, мг/г сухой массы					
	Розмариновая кислота	Кофейная кислота	Кафтаровая кислота	Цикориевая кислота	Цинарозид	Космосиин
MS-2	7,23 ± 1,12^{c}	0,52 ± 0,03^{b}	–	0,18 ± 0,04^{b}	–	–
MS-5	13,00 ± 1,96^{b}	0,42 ± 0,04^{b}	0,11 ± 0,02^{a}	0,14 ± 0,03^{b}	–	–
MS-6	20,25 ± 1,84^{a}	1,48 ± 0,08^{a}	0,10 ± 0,02^{a}	0,12 ± 0,03^{b}	–	–
Микрорастение *in vitro*	2,95 ± 0,59^{d}	1,44 ± 0,10^{a}	–	–	1,20 ± 0,36	0,48 ± 0,05
Нативное растение	12,46 ± 1,18^{b}	0,22 ± 0,01^{c}	–	0,30 ± 0,04^{a}	–	–
Коммерческий продукт	10,30 ± 1,42^{bc}	0,26 ± 0,01^{c}	–	0,15 ± 0,03^{b}	–	–

Примечание: Статистические результаты представлены в виде среднего ± стандартного отклонения. Разные буквы указывают на статистически значимые различия между растительным материалом для каждого соединения (ANOVA с апостериорным критерием Тьюки, $p \leq 0{,}05$); «–» – концентрации ниже предела обнаружения.

Note: Statistical results are presented as mean ± standard deviation Different letters indicate statistically significant differences between the plant materials for each compound (ANOVA with the Tukey's HSD *post hoc* test, $p \leq 0.05$); concentrations below limit of detection are marked with "–".

in vitro (1,44 ± 0,10 мг/г сухой массы). Низкое содержание кофейной кислоты выявили в нативном растении (0,22 ± 0,01 мг/г сухой массы) и в комерческом продукте (0,26 ± 0,01 мг/г сухой массы).

Ранее сообщалось, что доминирующим компонентом в *H. officinalis* является розмариновая кислота (169,2 ± 0,6 мг на 100 г), обладающая антиоксидантными, антибактериальными и противовирусными свойствами [1]. Наши данные показывают, что наибольшее статистически значимое (ANOVA, $F = 50{,}3$; $p \leq 0{,}001$) содержание розмариновой кислоты (20,25 ± 1,84 мг/г сухой массы) выявили в каллусной культуре, культивируемой на среде MS-6 с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д. В свою очередь наименьшее содержание розмариновой кислоты обнаружили в растении, культивируемом *in vitro* (2,95 ± 0,59 мг/г сухой массы).

Высокое содержание цикориевой кислоты выявили в нативном растении (0,29 ± 0,02 мг/г сухой массы), во всех остальных растительных объектах содержание цикориевой кислоты было меньше. В микрорастении *in vitro* цикориевая кислота отсутствовала. Кафтаровая кислота была обнаружена в каллусных культурах MS-5 (0,11 ± 0,02 мг/г сухой массы) и MS-6 (0,10 ± 0,02 мг/г сухой массы).

В нашем предыдущем исследовании было установлено, что среда MS, дополненная 2 мг/л кинетина в сочетании с 3 мг/л α-нафтилуксусной кислоты, приводила к наибольшему выходу вторичных метаболитов, в частности флавоноидов, полифенольных соединений, и отмечалось, что α-нафтилуксусная кислота может эффективно продуцировать вторичные метаболиты [16]. По данным настоящего исследования каллусная культура, выращенная на среде MS с добавлением 2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д (MS-6), продемонстрировала высокий выход фенольных соединений (35,5 ± 1,2 мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы), гидроксикоричных кислот (82,5 ± 2,6 мг-экв. розмариновой кислоты/г сухой массы), танинов (49,6 ± 0,8 мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы), а также наибольшее содержание розмариновой (20,25 ± 1,84 мг/г сухой массы) и кофейной (1,48 ± 0,08 мг/г сухой массы) кислот.

В результате анализа антиоксидантной активности исследуемых экстрактов *H. officinalis* методом DPPH установлено наличие значимых различий (ANOVA, $F = 252$; $p \leq 0{,}001$) (рис. 7). Наибольшей антиоксидантной активностью (127,8 ± 5,6 мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой массы) обладали экстракты каллусных культур MS-6, культивируемые на питательной среде MS с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д. Наименьшая антиоксидантная активность (12,9 ± 1,5 мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой массы) обнаружена в экстрактах каллусных культур MS-2 с добавлением 2 мл/л кинетина в сочетании с 3 мл/л α-нафтилуксусной кислоты.

Анализ антиоксидантной активности исследуемых экстрактов *H. officinalis* методом FRAP показал наличие значимых различий (ANOVA, $F = 27{,}6$; $p \leq 0{,}001$) (рис. 8). Наибольшей антиоксидантной активностью (15,9 ± 1,3 мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой массы) обладали экстракты каллусных культур MS-6. Экстракты нативного растения и микрорастений *in vitro* проявляли наименьшую антиоксидантную активность (8,6 ± 0,6 и 9,1 ± 0,9 мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой массы).

В процессе анализа антиоксидантной активности исследуемых экстрактов *H. officinalis* методом ABTS установили наличие значимых различий (ANOVA, $F = 105$; $p \leq 0{,}001$) (рис. 9). Наибольшую антиоксидантную активность выявили у экстрактов растений *in vitro* (90,4 ± 12,3 мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой

массы) и у экстрактов, полученных из коммерческого препарата *H. officinalis* (78,6 ± 5,1 мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой массы). Наименьшую антиоксидантную активность установили в экстрактах нативного растения (11,1 ± 0,5 мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой массы).

Во многих исследованиях сообщали о высокой антиоксидантной активности *H. officinalis* [4, 32]. Наши данные по исследованию антиоксидантной активности экстрактов каллусных культур, микрорастений *in vitro*, коммерческого препарата и нативного растения *H. officinalis* подтверждили это. Согласно

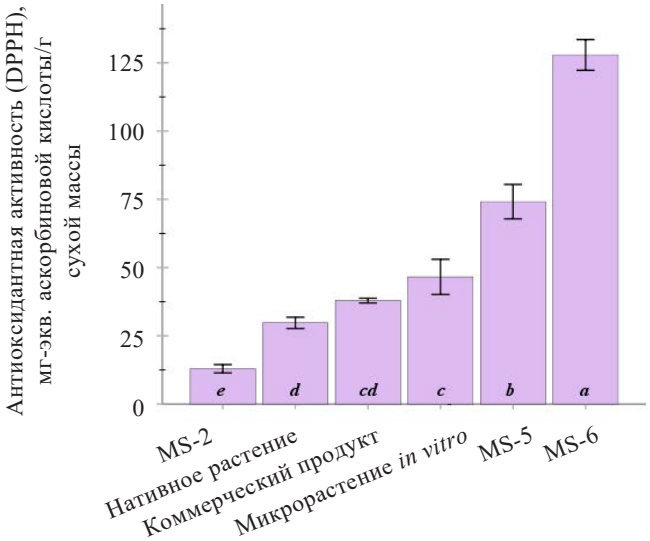

Рисунок 7. Антиоксидантная активность экстрактов в исследуемом растительном сырье *Hyssopus officinalis* L. Примечание: разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA с апостериорным критерием Тьюки, $p \leq 0{,}001$). DPPH – антиоксидантная активность, определяемая методом анализа 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила

Figure 7. Antioxidant activity of extracts in various *Hyssopus officinalis* L. materials. Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA with the Tukey's HSD *post hoc* test, $p \leq 0.001$). DPPH means antioxidant activity determined by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay

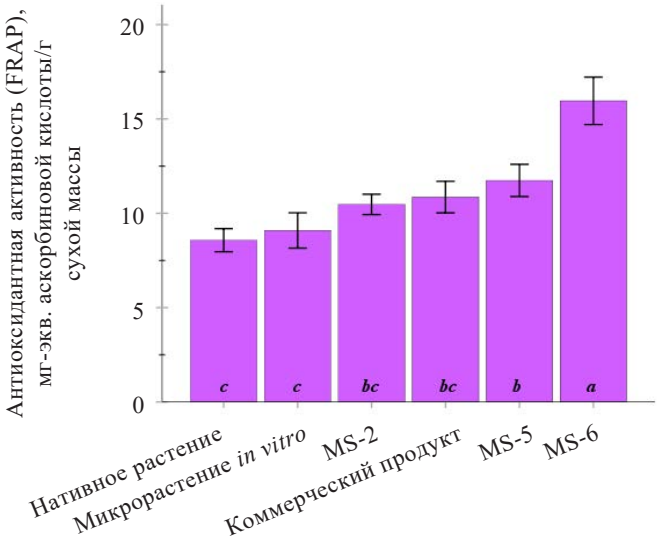

Рисунок 8. Антиоксидантная активность экстрактов в исследуемом растительном сырье *Hyssopus officinalis* L. Примечание: разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA с апостериорным критерием Тьюки, $p \leq 0{,}001$). FRAP – железовосстанавливающая антиоксидантная активность

Figure 8. Antioxidant activity of extracts in various *Hyssopus officinalis* L. materials. Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA with the Tukey's HSD *post hoc* test, $p \leq 0.001$). FRAP means iron-reducing antioxidant activity

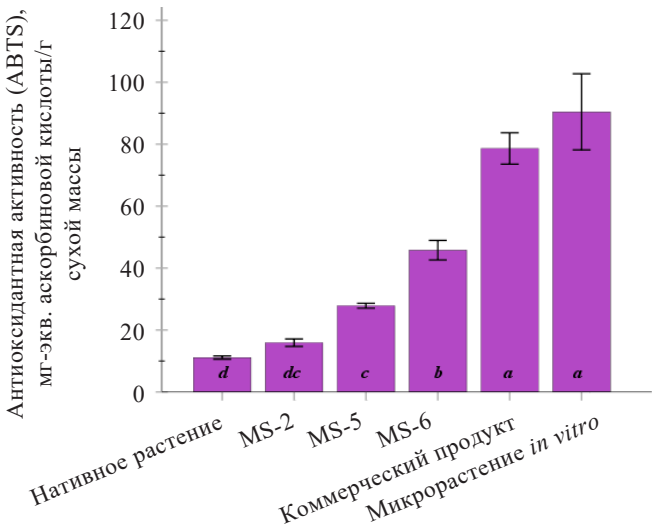

Рисунок 9. Антиоксидантная активность экстрактов в исследуемом растительном сырье *Hyssopus officinalis* L. Примечание: разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA с апостериорным критерием Тьюки, $p \leq 0{,}001$). ABTS – антиоксидантная активность, определяемая методом анализа 2,2′-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота)

Figure 9. Antioxidant activity of extracts in various *Hyssopus officinalis* L. materials. Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA with the Tukey's HSD *post hoc* test, $p \leq 0.001$). ABTS means antioxidant activity determined by the 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) assay

анализу DPPH и FRAP, самой высокой антиоксидантной активностью обладала каллусная культура, выращенная на среде MS с добавлением 2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д (MS-6). Однако по методу ABTS наибольшую антиоксидантную активность выявили у экстрактов микрорастений *in vitro* и у экстрактов, полученных из коммерческого препарата *H. officinalis*.

На основе нормализованных значений изученных фитохимических показателей была построена тепловая карта с кластерным анализом (рис. 10). Для построения использовали такие показатели, как содержание фенольных соединений, флавоноидов, танинов и гидроксикоричных кислот, антиоксидантная активность экстрактов растительного материала *H. officinalis* (с использованием методов DPPH, FRAP и ABTS). Для построения тепловой карты было учтено содержание розмариновой, кофейной и цикориевой кислот, выявленных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии во всех образцах растительного сырья *H. officinalis* (табл. 2).

Дендрограмма, представленная на рисунке 10, демонстрирует, что все изучаемые параметры можно разделить на два основных кластера. Первый кластер включает общие фенольные соединения, розмариновую кислоту, танины, гидроксикоричные кислоты, антиоксидантную активность (DPPH и FRAP) и цикориевую кислоту. Второй кластер включает суммарное содержание флавоноидов, антиоксидантную активность (ABTS) и кофейную кислоту.

Изученные образцы растительного материала *H. officinalis* были разделены на два кластера (рис. 10). На дендрограмме видно, что в обособленный кластер выделена каллусная культура MS-6, полученная на среде MS с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д, характеризующаяся высоким содержанием большинства групп изученных фенольных соединений и антиоксидантной активностью экстрактов. Во втором кластере можно заметить обособленность микрорастений *in vitro*, образующих отдельную подгруппу внутри этого кластера. Ее положение обусловлено высоким содержанием суммарных флавоноидов, кофейной кислоты и антиоксидантной активностью экстрактов, определенной по методу ABTS.

В результате корреляционного анализа была установлена связь между содержанием фенольных соединений, танинов, гидроксикоричных кислот, розмариновой кислоты и антиоксидантной активностью (DPPH и FRAP) экстрактов (рис. 11). Между этими параметрами коэффициенты корреляции составили 0,70–0,91 ($p \leq 0{,}01$).

Высокую отрицательную корреляцию зафиксировали между содержанием флавоноидов и фенольных соединений ($r = -0{,}73$, $p \leq 0{,}01$). Установили среднюю отрицательную корреляцию между содержанием флавоноидов и розмариновой кислотой ($r = -0{,}65$; $p \leq 0{,}01$) и среднюю положительную корреляцию между содержанием флавоноидов и антиоксидантной активностью, определенной методом ABTS ($r = 0{,}62$; $p \leq 0{,}01$).

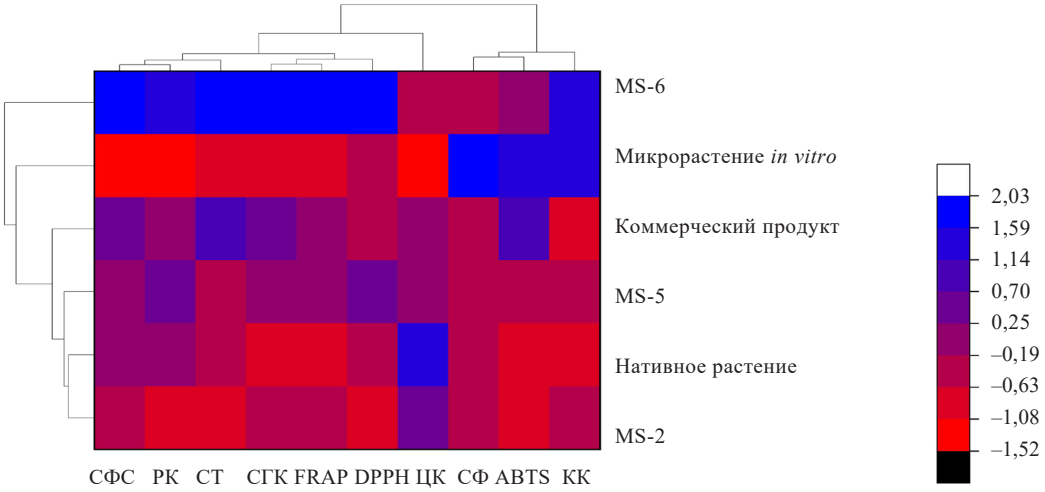

Рисунок 10. Тепловая карта с кластерами изученных фитохимических показателей (внизу) и растительного материала *Hyssopus officinalis* L. (справа). СФС – содержание фенольных соединений; РК – розмариновая кислота; СТ – содержание танинов; СГК – содержание гидроксикоричных кислот; FRAP – железовосстанавливающая антиоксидантная активность; DPPH – антиоксидантная активность, определяемая методом DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил); ЦК – цикориевая кислота; СФ – общее содержание флавоноидов; ABTS – антиоксидантная активность, определяемая методом ABTS (2,2′-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота)); КК – кофейная кислота

Figure 10. Heat map with clusters of phytochemical parameters (down) and *Hyssopus officinalis* L. materials (right). СФС – phenolic compounds; РК – Rosmarinic acid; СТ – Tannins; СГК – Hydroxycinnamic acid; FRAP – Iron-reducing antioxidant activity; DPPH – Antioxidant activity by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl); ЦК – Chicoric acid; СФ – Total flavonoid content; ABTS – Antioxidant activity by ABTS (2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); КК – Caffeic acid

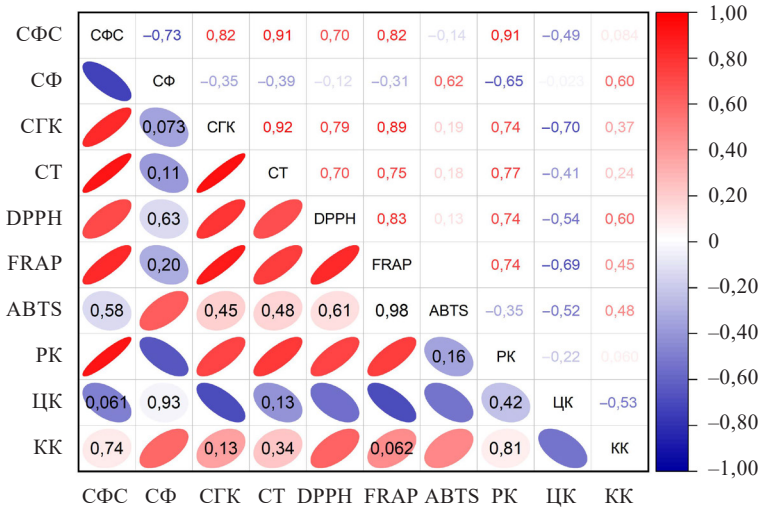

Рисунок 11. Корреляционная матрица изученных фитохимических показателей *Hyssopus officinalis* L. В верхней правой части представлены коэффициенты корреляции Пирсона ($-1 \le r \le 1$); в левой нижней части красные или синие овалы обозначают значимость корреляций – кружки без меток обозначают значимые корреляции ($p \le 0{,}05$); в остальных кружках или ячейках представлен уровень значимости корреляций ($p > 0{,}05$). СФС – содержание фенольных соединений; СФ – содержание флавоноидов; СГК – содержание гидроксикоричных кислот; СТ – содержание танинов; 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)); РК – розмариновая кислота; ЦК – цикориевая кислота; КК – кофейная кислота

Figure 11. Correlation matrix for phytochemical parameters of *Hyssopus officinalis* L. The upper right part presents the Pearson's correlation coefficients ($-1 \le r \le 1$); the red or blue ovals in the bottom left part indicate the significance of the correlations while the unmarked circles indicate significant correlations ($p \le 0.05$); the remaining circles or cells represent the significance level of the correlations ($p > 0.05$). СФС – Phenolic compounds; СФ – Flavonoids; СГК – Hydroxycinnamic acids; СТ – Tannins; DPPH – Antioxidant activity by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl); FRAP – Iron-reducing antioxidant activity; ABTS – Antioxidant activity by ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); РК – Rosmarinic acid; ЦК – Chicoric acid; КК – Caffeic acid

Общее содержание танинов в экстрактах *H. officinalis* показало высокий уровень корреляции с общим содержанием гидроксикоричных кислот ($r = 0{,}92$; $p \leq 0{,}01$), с содержанием розмариновой кислоты ($r = 0{,}77$; $p \leq 0{,}01$) и антиоксидантной активностью, определенной методом FRAP ($r = 0{,}75$; $p \leq 0{,}01$). Установили среднюю положительную корреляцию между содержанием танинов и антиоксидантной активностью экстрактов, определенной методом DPPH ($r = 0{,}70$; $p \leq 0{,}01$).

Установили сильную положительную корреляцию с общим содержанием гидроксикоричных кислот и антиоксидантной активностью, определенной методами DPPH ($r = 0{,}79$; $p \leq 0{,}01$) и FRAP ($r = 0{,}89$; $p \leq 0{,}01$), а также среднюю отрицательную корреляцию с содержанием цикориевой кислоты ($r = –0{,}70$; $p \leq 0{,}01$).

Антиоксидантная активность, определенная методом DPPH, показала высокую положительную корреляцию с антиоксидантной активностью, определенной методом FRAP ($r = 0{,}83$; $p \leq 0{,}01$), с содержанием розмариновой кислоты ($r = 0{,}74$; $p \leq 0{,}01$) и среднюю положительную корреляцию с содержанием кофейной кислоты ($r = 0{,}60$; $p \leq 0{,}01$), среднюю отрицательную корреляцию с содержанием цикориевой кислоты ($r = –0{,}54$; $p \leq 0{,}01$). Высокую положительную корреляцию установили между антиоксидантной активностью, определенной методом FRAP, и содержанием розмариновой кислоты ($r = 0{,}74$; $p \leq 0{,}01$). Общее содержание цикориевой кислоты показало среднюю отрицательную корреляцию с антиоксидантной активностью, определенной методом FRAP ($r = –0{,}69$; $p \leq 0{,}01$), определенной методом ABTS ($r = –0{,}52$; $p \leq 0{,}05$), и с содержанием кофейной кислоты ($r = 0{,}53$; $p \leq 0{,}05$).

В ходе нашего исследования была показана тесная связь антиоксидантной активности исследуемых экстрактов, определенных методом DPPH и FRAP с содержанием фенольных соединений, танинов, гидроксикоричных кислот, розмариновой и цикориевой кислотами. Установили связь между антиоксидантной активностью экстрактов, определенной методом ABTS и содержанием флавоноидов, кофейной кислоты. Наиболее перспективной каллусной культурой *H. officinalis* является каллусная культура, культивируемая на среде MS с добавлением 2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д (MS-6), которая характеризуется максимальной антиоксидантной активностью по методу DPPH и FRAP.

Таблица 3. Антибактериальная и фунгицидная активность экстрактов исследуемого растительного материала *Hyssopus officinalis* L. (зоны ингибирования включают диаметр диска 6 мм)

Table 3. Antibacterial and fungicidal activity of *Hyssopus officinalis* L. extracts with inhibition zones included in disk diameter (6 mm)

Растительный материал	Диаметр зоны ингибирования, мм					
	Канамицин, 50 мкг/диск	10 % диметилсульфоксида, 20 мкг/диск	Концентрация экстракта, мг/диск			
			0,25	0,50	1,00	2,00
Escherichia coli						
MS-2	21,0 ± 0,6	–	–	–	–	–
MS-5	21,3 ± 0,9	–	–	–	–	–
MS-6	19,3 ± 0,9	–	–	–	7,0 ± 0,3	7,3 ± 0,1
Микрорастение *in vitro*	18,0 ± 0,6	–	–	–	–	–
Коммерческий продукт	18,3 ± 1,4	–	–	–	–	–
Нативное растение	19,0 ± 0,6	–	–	–	–	–
Bacillus subtilis						
MS-2	22,0 ± 0,6	–	–	–	–	–
MS-5	20,7 ± 1,3	–	–	–	–	–
MS-6	19,3 ± 0,9	–	–	–	–	7,2 ± 0,2
Микрорастение *in vitro*	19,0 ± 0,6	–	–	–	–	–
Коммерческий продукт	22,0 ± 1,0	–	–	–	–	–
Нативное растение	21,0 ± 0,6	–	–	–	–	–
Candida albicans						
MS-2	22,0 ± 0,6	–	–	–	–	–
MS-5	22,0 ± 0,6	–	–	–	–	–
MS-6	22,0 ± 0,6	–	–	–	–	7,0 ± 0,2
Микрорастение *in vitro*	18,3 ± 0,9	–	–	–	–	–
Коммерческий продукт	21,3 ± 0,3	–	–	–	–	–
Нативное растение	20,0 ± 0,6	–	–	–	–	–

Примечание: «–» – зоны ингибирования не наблюдалось.

Note: “–” – means that no inhibition zone was detected.

В настоящем исследовании изучили антибактериальную и фунгицидную активность экстрактов растительного материала *H. officinalis* в отношении представителя грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, представителя грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* и сапротрофного дрожжеподобного гриба *Candida albicans* (табл. 3). Из всех исследуемых экстрактов очень слабая антибактериальная и фунгицидная активность против тестируемых микроорганизмов была обнаружена у экстракта каллусной культуры MS-6, культивируемого на среде MS с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д. При дозе экстракта каллусной культуры MS-6 1,0 и 2,0 мг/диск проявлялся некоторый антибактериальный эффект с незначительной активностью в отношении *E. coli* – диаметр зоны ингибирования 7,0 ± 0,3 и 7,3 ± 0,1 мм соответственно. Экстракт каллусной культуры MS-6 при дозе 2,0 мг/диск проявил очень слабое ингибирующее действие против *B. subtilis* и *C. albicans* – диаметр зоны ингибирования 7,2 ± 0,2 и 7,0 ± 0,2 мм соответственно. В исследовании по изучению антибактериальной активности экстрактов *H. officinalis* были показаны значительные ингибирующие эффекты на *S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* и *E. coli* в концентрации 200 и 400 мг/мл [2]. Кроме того, был продемонстрирован ингибирующий эффект против грибков [4].

Выводы

Результаты исследования показали, что каллусная культура *Hyssopus officinalis* L., культивируемая на питательной среде Мурасиге-Скуга с 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д, по сравнению с остальными объектами исследования, характеризуется высоким содержанием веществ фенольной природы, обладает выраженной антиоксидантной активностью и слабой антимикробной активностью. Исследуемые экстракты каллусных культур, микрорастений *H. officinalis*, культивируемых *in vitro*, в сравнении с экстрактом нативного растения показали количественно наилучший выход основных вторичных метаболитов. Это доказывает, что биотехнологический метод получения из растений важных соединений с применением клеточных культур является перспективным. Однако требуется дальнейшее изучение каллусных культур *H. officinalis* с целью повышения биосинтеза биологически активных веществ.

Критерии авторства

А. В. Пунгин, Е. А. Попова – концептуализация исследования, обработка результатов, подготовка и редактирование статьи. А. В. Пунгин, О. В. Кроль – методология. Е. А. Попова, А. П. Пантюхина, О. В. Кроль – проведение экспериментальных исследований. Все авторы ознакомились и согласились с опубликованной версией рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

A.V. Pungin and E.A. Popova developed the research concept, processed the results, and drafted the manuscript. A.V. Pungin and O.V. Krol designed the research methodology. E.A. Popova, A.P. Pantyukhina, and O.V. Krol conducted the experimental research. All the authors approved of the final version of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declared no conflict of interests regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. Kumar V, Kaur N, Kaur A, Wadhwa P. Phytochemistry and Pharmacology of Indian Traditional Plant Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.): A Review. The Natural Products Journal. 2023;13(4):e110822207418. https://doi.org/10.2174/2210315512666220811153919

2. 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;7(3):34–44. https://doi.org/10.29252/jorjanibiomedj.7.3.34

3. Judžentienė A. Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) Oils. In: Preedy VR, editor. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Academic Press; 2016. pp. 471–479. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00053-5

4. Tahir M, Khushtar M, Fahad M, Rahman MA. Phytochemistry and pharmacological profile of traditionally used medicinal plant *Hyssop* (*Hyssopus officinalis* L.). Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2018;8(7):132–140. https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8721

5. Zayova E, Geneva M, Stancheva I, Dimitrova L, Petrova M, Hristozkova M, *et al.* Evaluation of the antioxidant potential of in vitro propagated hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) with different plant growth regulators. International Journal of Phytomedicines and Related Industries. 2018;10(4):295–304. https://doi.org/10.5958/0975 6892.2018.00044.8

6. Borrelli F, Pagano E, Formisano C, Piccolella S, Fiorentino A, Tenore GC, *et al. Hyssopus officinalis* subsp. aristatus: An unexploited wild-growing crop for new disclosed bioactives. Industrial Crops and Products. 2019;140:111594. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111594

7. Ozyigit II, Dogan I, Hocaoglu-Ozyigit A, Yalcin B, Erdogan A, Yalcin IE, *et al.* Production of secondary metabolites using tissue culture-b ased biotechnological applications. Frontiers in Plant Science, 2023;14:1132555. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1132555

8. Efferth T. Biotechnology applications of plant callus cultures. Engineering. 2019;5(1):50–59. https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006

9. Bulavin IV, Ivanova NN, Mitrofanova IV. *In vitro* regeneration of *Hyssopus officinalis* L. and plant genetic similarity. Doklady Biological Sciences. 2021;499:109–112. https://doi.org/10.1134/S0012496621040013

10. Soheili S, Miri SM, Ghazijahani N. Callus Induction from *In Vitro* Cultured Leaf, Hypocotyl and Root of *Hyssopus officinalis*. In The First National Conference on the Application of Advancedchemical and Agricultural Research for Development of Medicinal Plants; 2021.

11. Morovatti S, Zebarjadi A, Bahraminejad S, Nadhaphy A. Effect of plant growth regulators on callogenesis and regeneration of *Hyssopus officinalis* in *in vitro* conditions. Agricultural Biotechnology Journal. 2021;13(3):187–204. https://doi.org/10.22103/jab.2021.16756.1277

12. Maslova E, Gulya N, Perelugina T, Semykina V, Kalashnikova E. Introduction of *Hyssopus officinalis* L. into *in vitro* culture to optimize the conditions for obtaining callus tissues and microclonal propagation as a promising metod of innovative agrobiotechnologies BIO Web of Conferences. 2021;30:05006. https://doi.org/10.1051/bioconf/20213005006

13. Skrzypek Z, Wysokińska H. Sterols and triterpenes in cell culture of *Hyssopus officinalis* L. Zeitschrift für Naturforschung C. 2003;58(5–6):308–312. https://doi.org/10.1515/znc-2003-5-602

14. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 1962;15(3):473–497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

15. Sadat-Hosseini M, Soleimani A. Callus Induction, Shoot and Root Regeneration in *Hyssopus officinalis* using Sodium Nitroprusside and Plant Growth Regulators. Journal of Medicinal plants and By-product. 2023. https://doi.org/10.22034/JMPB.2023.363600.1611

16. Babich O, Sukhikh S, Pungin A, Astahova L, Chupakhin E, Belova D, *et al.* Evaluation of the Conditions for the Cultivation of Callus Cultures of *Hyssopus officinalis* Regarding the Yield of Polyphenolic Compounds. Plants. 2021;10(5):915. https://doi.org/10.3390/plants10050915

17. Bibi A, Khan MA, Adil M, Mashwani ZUR. Production of callus biomass and antioxidant secondary metabolites in black cumin. The Journal of Animal and Plant Sciences. 2018;28(5):1321–1328.

18. Padhi EMT, Liu R, Hernandez M, Tsao R, Dan Ramdath 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;38:602–611. https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.11.006

19. Sevket ALP, Ercisli S, Jurikova T, Cakir O, Gozlekci S. Bioactive Content of Rose Hips of Different Wildly Grown *Rosa dumalis* Genotypes. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 2016;44(2):472–476. https://doi.org/10.15835/nbha44210432

20. Štefan MB, Rodríguez VJ, Blažeković B, Kindl M, Vladimir-Knežević S. Total Hydroxycinnamic Acids Assay: Prevalidation and Application on *Lamiaceae* Species. Food Analytical Methods. 2013;7:326–336. https://doi.org/10.1007/s12161-013-9630-8

21. Feduraev P, Skrypnik L, Nebreeva S, Dzhobadze G, Vatagina A, Kalinina E, *et al.* Variability of Phenolic Compound Accumulation and Antioxidant Activity in Wild Plants of Some *Rumex* Species (*Polygonaceae*). Antioxidants. 2022;11(2):311. https://doi.org/10.3390/antiox11020311

22. Skrypnik L, Grigorev N, Michailov D, Antipina M, Danilova M, Pungin A. Comparative study on radical scavenging activity and phenolic compounds content in water bark extracts of alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.), oak (*Quercus robur* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.). European Journal of Wood and Wood Products. 2019;77:879–890. https://doi.org/10.1007/s00107-019-01446-3

23. Skrypnik L, Feduraev P, Golovin A, Maslennikov P, Belov N, Matveev M, *et al.* Biotechnological Potential of Different Organs of Mistletoe (*Viscum album* L.) Collected from Various Host Tree Species in an Urban Area. Plants. 2022;11(20):2686. https://doi.org/10.3390/plants11202686

24. Milentyeva IS, Fedorova AM, Larichev TA, Altshuler OG. Biologically active compounds in *Scutellaria baicalensis* L. callus extract: Phytochemical analysis and isolation. Foods and Raw Materials. 2023;11(1):172–186. https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-1-564

25. Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Možina SS. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. Journal of Microbiological Methods. 2010;81(2):121–126. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004

26. Bertani G. Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems. Journal of Bacteriology. 2004;186(3):595–600. https://doi.org/10.1128/jb.186.3.595-600.2004

27. Espinosa-Leal CA, Puente-Garza CA, García-Lara S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. Planta. 2018;248:1–18. https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1

28. Tungmunnithum D, Thongboonyou A, Pholboon A, Yangsabai A. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. Medicines. 2018;5(3):93. https://doi.org/10.3390/medicines5030093

29. Milentyeva IS, Vesnina AD, Fedorova AM, Ostapova EV, Larichev TA. Chlorogenic Acid and Biohanin A from *Trifolium pratense* L. Callus Culture Extract: Functional Activity *In Vivo*. Food Processing: Techniques and Technology. 2023;53(4):754–765. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-4-2475; https://elibrary.ru/GGYCQG

30. Sun W, Shahrajabian MH. Therapeutic Potential of Phenolic Compounds in Medicinal Plants–Natural Health Products for Human Health. Molecules. 2023;28(4):1845. https://doi.org/10.3390/molecules28041845

31. Pizzi A. Tannins: Prospectives and Actual Industrial Applications. Biomolecules. 2019;9(8):344. https://doi.org/10.3390/biom9080344

32. Sharifi-Rad J, Quispe C, Kumar M, Akram M, Amin M, Iqbal M, *et al. Hyssopus* Essential Oil: An Update of Its Phytochemistry, Biological Activities, and Safety Profile. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2022; 2022(1):8442734. https://doi.org/10.1155/2022/8442734