

УДК 581.1:57.085.23

ОСОБЕННОСТИ РОСТА И НАКОПЛЕНИЯ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУРАХ ЛАВАНДЫ УЗКОЛИСТНОЙ (*Lavandula angustifolia* MILL.)

© 2024 г. П. А. Иванов^а, В. А. Хабаров^а, Д. А. Некрасова^а,
Н. С. Пивоварова^а, А. К. Уэйли^а, М. Н. Пovyдыш^{а, *}

^аФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет”
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
*e-mail: maria.povydysh@pharminnotech.com

Поступила в редакцию 04.09.2023 г.

После доработки 05.02.2024 г.

Принята к публикации 07.02.2024 г.

Определены ростовые характеристики и компонентный состав полифенольных соединений каллусных культур клеток лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* Mill.), выращенных на питательных средах различного состава. Одним из продуктивных биотехнологических подходов к регуляции синтеза вторичных метаболитов является добавление в питательную среду фитогормонов. Было установлено, что на накопление фенольных соединений (фенольных кислот, флавоноидов, антоцианов) может положительно влиять присутствие α -нафтилуксусной кислоты (НУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), 6-бензиламинопурина (БАП) и кинетина. Для каждой питательной среды были построены кривые роста и рассчитаны ростовые параметры. Анализ, проведенный с использованием методов обратнофазной ВЭЖХ с УФ-спектрофотометрической детекцией, позволил выявить во всех образцах каллусных культур лаванды розмариновую кислоту в качестве мажорного соединения. Выявлены закономерности накопления розмариновой кислоты под влиянием таких факторов, как освещенность и состав питательной среды. Из четырех исследованных сред наиболее высокие значения ростовых параметров и содержания розмариновой кислоты ($1.26 \pm 0.13\%$) были получены на среде, содержащей 2.0 мг/л α -НУК и 0.1 мг/л БАП.

Ключевые слова: *Lavandula angustifolia* Mill., вторичные метаболиты, розмариновая кислота, *in vitro*

DOI: 10.31857/S0015330324030061, EDN: NMKWNУ

ВВЕДЕНИЕ

Культуры лекарственных растений *in vitro*, в том числе каллусные культуры, не нашли широкого применения в фармацевтической индустрии (за исключением немногих успешных проектов [1]). Это может объясняться трудоемкостью масштабирования (трансфера) технологии из лаборатории в производство, высокой затратностью производства, сложностью стандартизации культур из-за разнородности содержания синтезируемых вторичных метаболитов, возможностью синтеза минорных веществ, присутствующих в интактных растениях в следовых количествах. Последняя из вышеуказанных причин не всегда является недостатком, так как при подборе определенных условий в культурах *in vitro* может быть достигнуто избирательное накопление биологически активных веществ (БАВ). Помимо этого, культивирование *in vitro* дает возможность строго контролировать и регламентировать процесс выращивания и содер-

жание вторичных метаболитов в получаемых продуктах. Несмотря на ограничения промышленного использования, различные культуры растений *in vitro* нашли применение в косметологии и производстве биологически активных добавок (БАД) [2].

Лаванда узколистная (*Lavandula angustifolia* Mill.) из сем. *Lamiaceae* – эфиромасличная культура, широко используемая в косметологии и парфюмерии. Состав эфирного масла лаванды узколистной хорошо изучен [3, 4]. В нем преобладают линалилацетат, 1,8-цинеол, линалоол, α -терпинеол, лимонен, камфора. Среди полифенольных соединений в надземной части лаванды обнаружены фенольные кислоты (розмариновая, феруловая, галловая, хлорогеновая, эллаговая и кофейная кислоты) и флавоноиды (в основном, производные апигенина, лютеолина и кверцетина, кумарины и танины) [5, 6]. Надземная часть, цветки и эфирное масло лаванды обладают противогрибковым, антибак-

териальным, неврологическим, противомикробным, антипаразитарным, антидиабетическим и обезболивающим действием [7–9]. Комплекс полифенольных соединений обладает выраженной способностью к подавлению свободных радикалов; наибольшую активность проявляют розмариновая и изосальвианоловая кислоты, лавандуфурандиол и лавандуфлюорен [10]. Перечень лекарственных средств на основе сырья лаванды ограничен. Сырье лаванды входит в состав ряда БАД седативного (“Кармолис®” – капли для приема внутрь, “Лаванда-антистресс, капсулы” (ЗАО “Эвалар”), “Олеокапс № 7” (ООО “Русбио”) и др.), мочегонного, противосудорожного, спазмолитического действия (“Лаванды цветки и трава” (ООО “Компания Хорст”) и др.).

Естественный ареал лаванды узколистной охватывает горные районы Средиземноморья от Испании до Франции и Италии. Несмотря на высокую приспособленность лаванды к различным климатическим условиям, в России территории, пригодные для ее выращивания в промышленных масштабах, расположены на Крымском полуострове и в некоторых районах Краснодарского края.

Ценность сырья лаванды узколистной наряду с трудностями выращивания на территории РФ требует внедрения эффективных методов культивирования *in vitro*, в том числе для производства ценных вторичных метаболитов. Наиболее изучены возможности клонального микроразмножения лаванды [11], тогда как каллусные культуры исследовались, главным образом, с точки зрения ростовых характеристик и способности к органогенезу [12]. Представляется целесообразным оценить химический состав каллусных культур и оптимизация условий культивирования для достижения максимального выхода БАВ.

Цель работы – исследование особенностей роста, качественная и количественная оценка вторичных метаболитов фенольной природы, оптимизация условий культивирования каллусных культур *Lavandula angustifolia* для достижения максимального выхода БАВ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на базе лаборатории культур растительных клеток ФГБОУ ВО “Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет” (СПХФУ) Минздрава России в 2022 – 2023 г.

Введение в культуру *in vitro*. В качестве объектов исследования использованы каллусные культуры лаванды узколистной, полученные в 2021 г. [13]. Растительный материал для введения в культуру *in vitro* получали в питомнике лекарственных растений СПХФУ (пос. Лемболово, Ленинградская область).

Питательную среду готовили по прописи Мурасиге-Скуга (MS) [14] с добавлением α -нафтилуксусной кислоты (α -НУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), 6-бензиламинопурина (БАП) и кинетина. В большинстве работ, посвященных оптимизации каллусогенеза представителей семейства *Lamiaceae* и, в частности, лаванды узколистной [15, 16], среди цитокининов отдается предпочтение БАП. В 2015 г. Nishikawa с соавт. [17] провели сравнительный анализ различных сочетаний индолилуксусной кислоты (ИУК), 2,4-Д, кинетина и БАП для каллусных культур *L. angustifolia*. Наилучшие результаты достигались на средах, дополненных 2 мг/л БАП и 2 мг/л 2,4-Д. Кинетин, в свою очередь, показывал посредственные результаты, в особенности при культивировании на свету и в сочетании с 2,4-Д. На основании литературных данных были предложены сочетания гормонов, приведенные в таблице. 1.

Таблица 1. Составы и условные обозначения питательных сред, используемых для культивирования каллусных культур *Lavandula angustifolia*

Условное обозначение	Содержание фитогормонов	
	К (контроль)	α -НУК (2.0 мг/л)
2Д	2,4-Д (2.0 мг/л)	БАП (2.0 мг/л)
1Н	α -НУК (1.0 мг/л)	БАП (0.5 мг/л)
2Н	α -НУК (2.0 мг/л)	БАП (0.1 мг/л)

Культивирование осуществляли в сосудах объемом 250 мл (объем питательной среды составлял 50 ± 5 мл), закрытых ватно-марлевой пробкой и бумагой, при температуре 25°C и влажности воздуха, равной 60–70%, для предотвращения испарения влаги из питательной среды и усыхания культур. Культивирование проводили параллельно в темноте (т) и на свету (с), с соблюдением фотопериода длительностью в 16 ч. Освещенность в световой комнате была равна 10000 Лк. [18]. Пересадку культур осуществляли в ламинар-боксе в помещении класса С, квалифицированного по стандартам GMP. Цикл субкультивирования составлял 21 сут.

Определение жизнеспособности клеток. До начала цикла культивирования часть культуры, предназначенной для пассажа, брали для микроскопического анализа. В качестве витального красителя использовали нейтральный красный. Микрофотографии клеток получены с помощью цифровой камеры Bresser LCD 50x-2000x

(“Bresser”, Германия) с применением техники “давленный” препарат при увеличении $\times 200$.

Определение ростовых параметров. Предварительно взвешенные при пересадке культуры принимали за начальную массу (m_0), по достижении заданной временной точки вновь измеряли массу культуры (m_1). Все измерения проводили на сырой вес.

Индекс роста определяли по формуле:

$$I = \frac{m_{max} - m_0}{m_0}, \text{ где:}$$

m_{max} – масса культуры в фазе максимального прироста (г);

m_0 – начальная масса (г).

Удельную скорость роста в экспоненциальной фазе (μ) определяли по формуле:

$$\mu = \frac{\ln m_2 - \ln m_1}{t_2 - t_1}, \text{ где:}$$

μ – удельная скорость роста, сут.⁻¹;

$\ln m_2$ и $\ln m_1$ – логарифмические индексы роста массы культуры в конечный и начальный момент экспоненциальной фазы, соответственно (с учетом того, что различием между начальными массами можно в данном случае пренебречь);

t_2 и t_1 – время начала и конца экспоненциальной фазы роста;

m_2 и m_1 – масса в конце и в начале экспоненциальной фазы.

Определение границ фаз производили по кривой роста в полулогарифме.

Время удвоения биомассы (τ) рассчитывали по формуле:

$$\tau = \frac{\ln 2}{\mu}, \text{ где:}$$

τ – время удвоения биомассы, сут.;

μ – удельная скорость роста, сут.⁻¹.

Фитохимический анализ. Каллусные культуры высушивали в потоке воздуха (40°C) в сушильном бытовом шкафу СП-100 (“Нефтехимгруп”, Россия) и измельчали. Высушенную биомассу хранили в пенициллиновых флаконах при комнатной температуре в сухом темном месте. Для сравнительного фитохимического анализа использовали лекарственное растительное сырье (ЛРС) – высушенные и измельченные цветки и листья лаванды узколистной (производитель ООО “Хорст”, Россия).

Качественный анализ групп БАВ проводили с помощью общепринятых фитохимических методов, рекомендованных Государственной фармакопеей РФ [19].

Для определения компонентного состава каллусной культуры методом ВЭЖХ использовали извлечения, полученные с помощью 96% этилового спирта методом экстракции на водяной бане в течение 5 мин при соотношении

сырье : экстрагент 1 : 4. Аналитическая хроматографическая система состояла из жидкостного хроматографа Shimadzu prominence LC-20AD, оснащенного автосамплером Shimadzu Prominence SIL-20A (“Shimadzu”, Япония), колонкой Supelcosil LC-18 25 см \times 4.6 мм, 5 мкм (“Sigma-Aldrich”, США) и диодно-матричным детектором Shimadzu Prominence SPD-M20A (“Shimadzu”, Япония). Система подвижной фазы состояла из элюента А – воды ультрачистой, полученной с использованием системы arium® mini (“Sartorius”, Германия) с добавлением 0.1% трифторуксусной кислоты (ТФУ) (v/v) (“PanReac AppliChem”, Германия), и элюента Б – ацетонитрила HPLC Far UV/Gradient Grade (“J.T. Baker”, США) с добавлением 0.1% ТФУ.

Профиль элюции: 0.01–5.0 мин 5% Б (изократический режим), 5.0–45.75 мин 5–100% Б (линейный градиент), 45.75–50.0 мин 100% Б (изократический режим), 50.0–60.0 мин 100–5% Б (линейный градиент), 60.0–65.0 мин 5% Б (изократический режим, приведение колонки в равновесие). Ввод анализируемого образца осуществляли в объеме 10 мкл, температура колонки во время анализа составляла 40°C, используемая скорость потока 1 мл/мин. Запись УФ-спектра осуществляли в диапазоне от 100 до 400 нм, аналитические длины волн – 235, 254, 280 и 340 нм.

Для определения суммы фенольных соединений (ФС) использовали методику по определению ФС в микрообъемах, основанную на реактиве Фолина–Чокальтеу [20]. Измельченные пробы сырья массой 0.05 г растирали с 1.5 мл 96% этанола в пробирках типа Эппендорф, экстрагировали в течение 45 мин при температуре 45°C с периодическим перемешиванием (каждые 15 мин) и центрифугировали в течение двух минут при частоте вращения 16000 об/мин.

Из полученных экстрактов отбирали образцы по 0.075 мл, к каждому образцу добавляли по 0.075 мл реактива Фолина–Чокальтеу, разбавленного в 5 раз, перемешивали, через 3 мин добавляли по 0.15 мл 20% раствора натрия углекислого и по 1.2 мл дистиллированной воды, перемешивали и оставляли при комнатной температуре. Через 1 ч измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 725 нм против холостого опыта. Длина оптического пути – 1 см.

Суммарное количество ФС, содержащееся в 1 г сырья, рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{D \cdot V}{K \cdot M \cdot 1000}, \text{ где}$$

C – суммарное количество ФС в мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы сырья;

D – оптическая плотность раствора при 725 нм;

K – тангенс угла наклона калибровочной кривой;

V – объем экстракта, мл;

M – масса сырья, г.

Для количественного ВЭЖХ-анализа использовали высушенные цветки *L. angustifolia* и каллусную культуру, выращенную на среде 2Н. Сырье измельчали, просеивали сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Точную навеску сырья подвергали экстракции спиртом этиловым 96% в соотношении сырье (г): экстрагент (мл), равном 4.0 : 100 (1 : 20). Экстракцию проводили на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин с момента закипания растворителя. Полученные экстракты охлаждали, фильтровали и доводили спиртом до 100 мл. Полученные растворы анализировали ранее описанным ВЭЖХ-методом. Все эксперименты проводили в трех повторностях.

Содержание розмариновой кислоты в исследуемых образцах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{C' \cdot V \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - W) \cdot 1000}, \text{ где:}$$

X – содержание розмариновой кислоты в растительном сырье, %;

C' – концентрация розмариновой кислоты в извлечении, мг/мл;

V – объем экстрагента, используемого для приготовления экстракта, мл;

m – масса навески сырья, г;

W – влажность растительного сырья, %.

Обработка данных. Исследование ростовых параметров культуры клеток и содержания в ней фенольных соединений проводились на шестые, тринадцатые, двадцатые и двадцать седьмые сутки культивирования. Для каждой временной точки использовали по 3–4 культивационных сосуда в качестве биологических повторностей. На графиках приведены средние значения и стандартное отклонение (SD), если не указано иное. Данные проверяли на нормальное распределение с помощью теста Шапиро–Вилка (в случае малого размера выборок – ростовые показатели) и теста Д'Агостино–Пирсона. Для измерения статистической значимости различий между экспериментальными вариантами использовали тест Тьюки при проведении двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA. Статистическая обработка, анализ данных и построение графиков проводились в программе GraphPad Prism, Dotmatics и Excel, Microsoft Corporation.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ростовые характеристики. Жизнеспособность культур проверяли до пассажа посредством окрашивания витальным красителем нейтральным красным (рис. 1). Показано, что подавляющее большинство визуализированных клеток жизнеспособно и окрашено в красный цвет, клетки имеют паренхимную форму и достаточ-

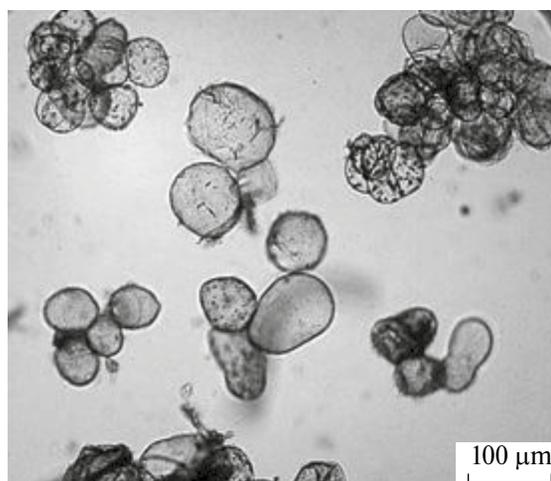


Рис. 1. Микрофотография каллусной культуры *L. angustifolia*

но крупные размеры. Ростовые характеристики культур, выращиваемых при световом (рис. 2а) и темновом (рис. 2б) режимах освещения, представленные в виде кривых роста и производных от них (индекс роста, удельная скорость роста и время удвоения) (табл. 2), позволяют отнести каллусные культуры лаванды узколистной к хорошо растущим. Индексы роста в среднем равны 4, удельная скорость роста μ находится в пределах 0.11 – 0.13 сут.⁻¹ Лучшая удельная скорость роста достигала 0.16 ± 0.01 сут.⁻¹ (индекс роста 7.53 ± 0.59) и была показана для культуры, выращиваемой на среде 2Н.

Фитохимический анализ. По результатам предварительного фитохимического анализа во всех образцах были обнаружены кумарины, дубильные вещества и флавоноиды. Методом ТСХ в системе *n*-бутанол : уксусная кислота : вода (4 : 1 : 2) в УФ- и видимом свете были предварительно идентифицированы кверцетин, лютеолин, апигенин, рутин, розмариновая, хлорогеновая и кофейная кислоты [21].

Результаты количественного анализа суммы ФС по методу Фолина–Чокальтеу во всех образцах клеточных культур при световом (рис. 3а) и темновом (рис. 3б) режимах культивирования показали сходные тенденции зависимости содержания ФС от времени – максимальное содержание достигалось к 13 дню культивирования, а затем наблюдалось снижение. По результатам ANOVA и теста Тьюки для множественных сравнений статистически значимый ($P < 0.0001$) вклад в различия между отдельными опытами дают время (12.13%), тип среды (30.65%) и их сочетание (15.57%) (табл. 3). Световой режим не влияет на накопление ФС со статистической значимостью. По результатам множественных сравнений можно заключить, что культура, выращенная на среде 2Н,

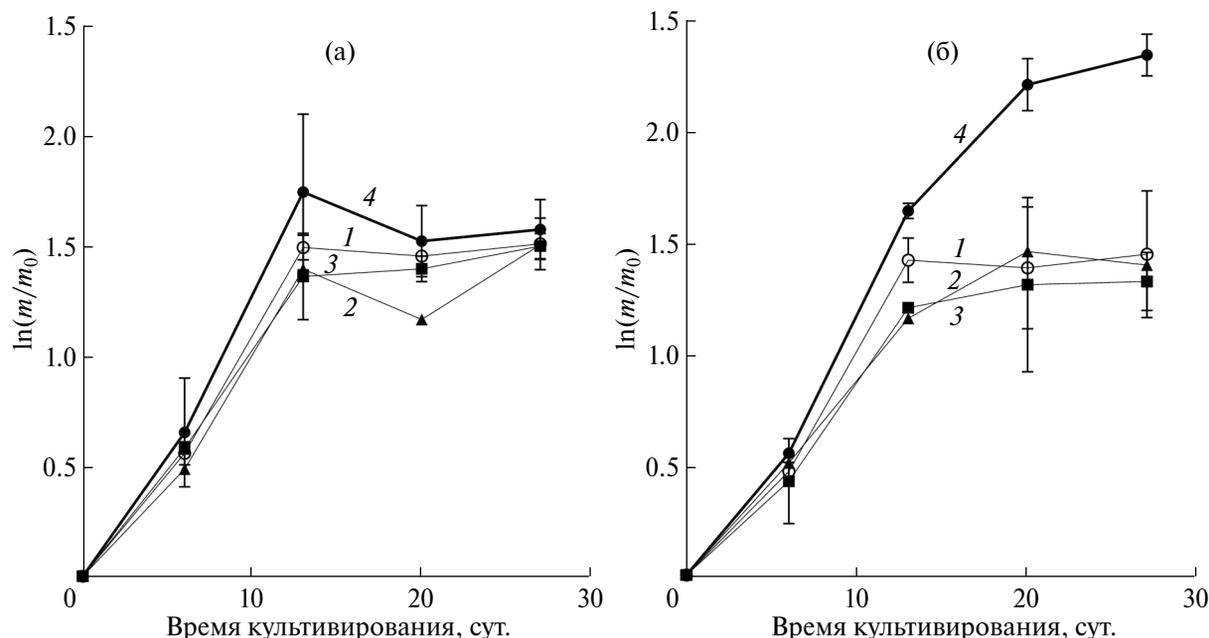


Рис. 2. Кривые роста клеток каллусной культуры *L. angustifolia* в полулогарифмической системе координат при световом (а) и темновом (б) режимах освещения на питательных средах, содержащих: 1 – α -НУК (2.0 мг/л) + кинетин (0.001 мг/л); 2 – 2,4-Д (2.0 мг/л) + БАП (2.0 мг/л); 3 – α -НУК (1.0 мг/л) + БАП (0.5 мг/л); 4 – α -НУК (2.0 мг/л) + БАП (0.1 мг/л).

Таблица 2. Ростовые характеристики каллусных культур *L. angustifolia*

Условия культивирования		Индекс роста, I	Удельная скорость роста, μ , сут. ⁻¹	Время удвоения, τ , сут.
Контроль	Темновой режим	3.7 ± 0.2	0.13 ± 0.01	5.36 ± 0.16
	Световой режим	4.2 ± 0.5	0.13 ± 0.01	5.53 ± 0.24
2Д	Темновой режим	3.5 ± 0.2	0.12 ± 0.02	5.86 ± 0.09
	Световой режим	3.3 ± 0.6	0.12 ± 0.02	5.96 ± 0.13
1Н	Темновой режим	3.5 ± 0.3	0.12 ± 0.04	5.90 ± 0.20
	Световой режим	3.8 ± 1.4	0.12 ± 0.01	6.05 ± 0.14
2Н	Темновой режим	5.6 ± 1.3	0.14 ± 0.01	5.02 ± 0.23
	Световой режим	7.5 ± 0.6	0.16 ± 0.01	4.29 ± 0.08

содержащей 2.0 мг/л α -НУК и 0.1 мг/л БАП, дает больший выход фенольных соединений в сравнении с остальными. Таким образом, данный состав продемонстрировал наиболее высокие значения ростовых параметров и содержания фенольных соединений.

На следующем этапе работы химический состав каллусных культур в сравнении с ЛРС лаванды узколистной был проанализирован методом ВЭЖХ-УФ при длине волны 254 нм. В отличие от хроматограммы ЛРС, на которой наблюдается не менее 30 пиков, компонентный состав каллусных культур является менее

разнообразным – хроматограммы содержат от 3 до 6 основных пиков. На рис. 4 представлены ВЭЖХ хроматограммы 96% этанольного экстракта цветков *L. angustifolia* (рис. 4а) и каллусной культуры 2Н (рис. 4б). Особый интерес представляет пик со временем удерживания ~21 мин, обнаруженный на всех хроматограммах и количественно превосходящий все прочие. На основании справочных данных и сравнения времени удерживания/УФ-спектра со стандартным образцом розмариновой кислоты, данное вещество было идентифицировано как розмариновая кислота. Для сравнения содержа-

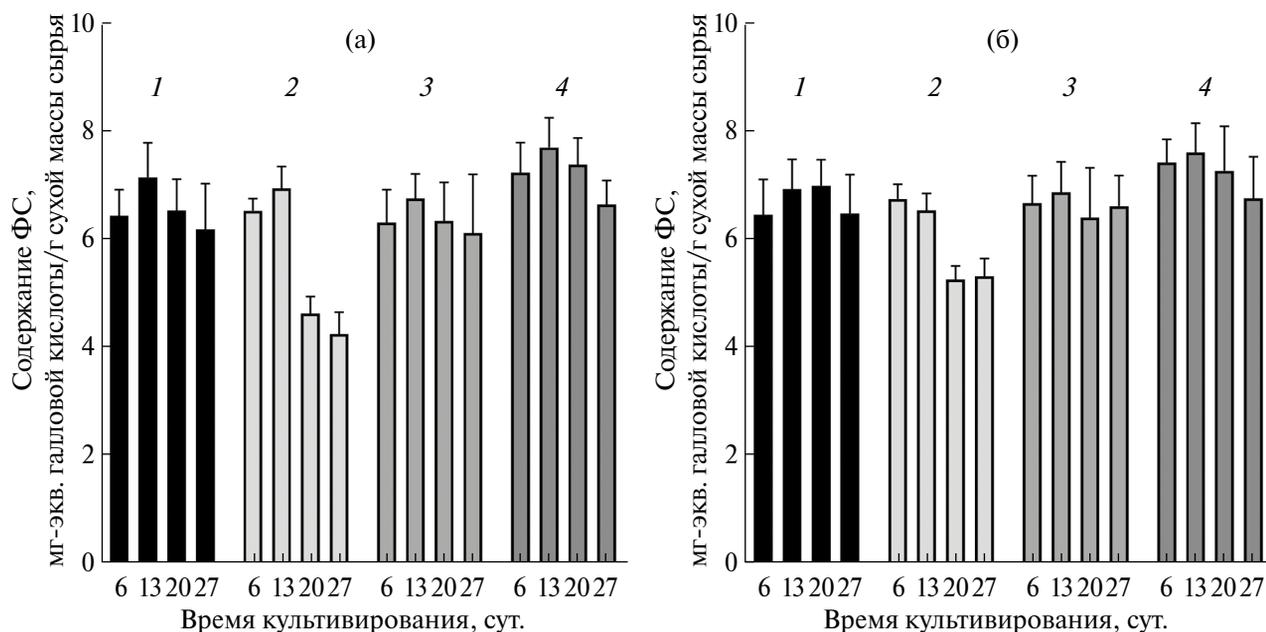


Рис. 3. Динамика содержания фенольных соединений в каллусной культуре клеток *L. angustifolia* при световом (а) и темновом (б) режимах культивирования на средах, содержащих: 1 – α -НУК (2.0 мг/л) + кинетин (0.001 мг/л); 2 – 2,4-Д (2.0 мг/л) + БАП (2.0 мг/л); 3 – α -НУК (1.0 мг/л) + БАП (0.5 мг/л); 4 – α -НУК (2.0 мг/л) + БАП (0.1 мг/л).

Таблица 3. Статистическая значимость различий в содержании ФС в культурах на разных средах при различной длительности культивирования

К	13 день								
	20 день	ns							
2Д	13 день	ns	ns						
	20 день	****	****	****					
1Н	13 день	ns	ns	ns	****				
	20 день	***	ns	ns	****	ns			
2Н	13 день	**	****	****	****	****	****		
	20 день	ns	*	*	****	*	****	ns	
		13 день	20 день						
		К		2Д		1Н		2Н	

Примечание: ns – различия статистически не достоверны, * – P от 0.01 до 0.05, ** – P от 0.001 до 0.01, *** – P от 0.0001 до 0.001, **** – $P < 0.0001$.

ния розмариновой кислоты в сырье интактного растения лаванды и каллусных культур проводили ВЭЖХ-анализ их экстрактов. В качестве объектов исследования использовали высушенные цветки *L. angustifolia* и каллусную культуру, выращенную на среде 2Н. Все эксперименты проводились в трех повторностях, данные представлены в виде среднего значения трех измерений со стандартной ошибкой ($P < 0.05$).

Содержание розмариновой кислоты в каллусе *L. angustifolia* на среде 2Н достигло $1.26 \pm 0.13\%$, тогда как в цветках интактного растения оно составило всего $0.33 \pm 0.009\%$. Причем следует отметить, что на ВЭЖХ-хроматограмме каллусной культуры (рис. 4б) относительная площадь пика розмариновой кислоты составила примерно 50.0% в сравнении с 11.5% на хроматограмме цветков (рис. 4а).

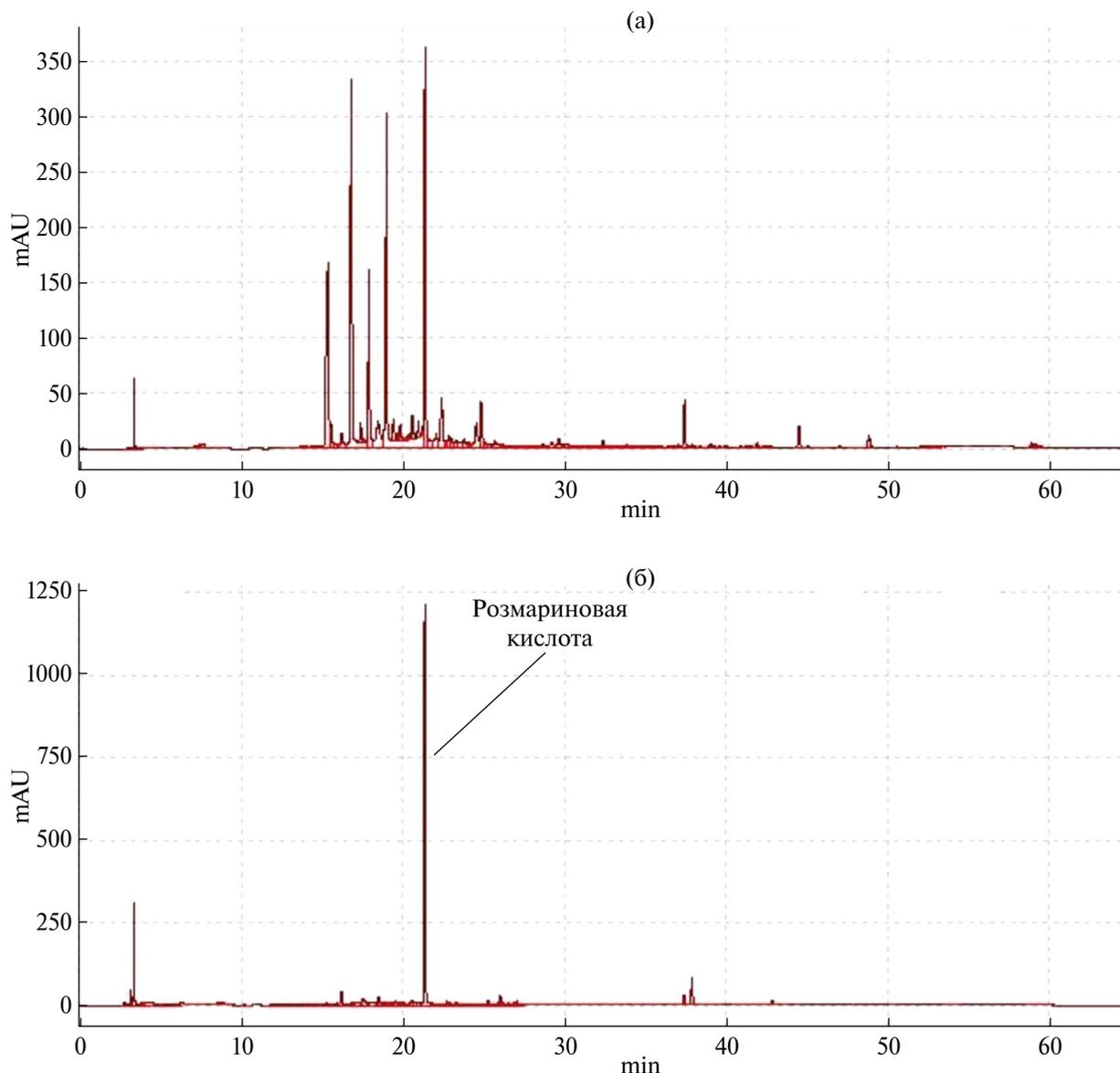


Рис. 4. ВЭЖХ-хроматограммы 96% этанольного экстракта цветков *L. angustifolia* (а) и каллусной культуры 2Н (б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали перспективность *in vitro* культур лаванды узколистной в качестве потенциального источника розмариновой кислоты. Розмариновая кислота — эфир кофейной кислоты и 3,4-дигидроксифенил молочной кислоты — достаточно часто встречается в растениях семейства *Lamiaceae*. Данное соединение имеет широкий спектр применения в качестве консерванта и антиоксиданта в пищевой промышленности а также противовоспалительного и антиоксидантного компонента в косметических средствах. В фармацевтической промышленности розмариновая кислота используется благодаря антиоксидантным, гепатопротекторным, нефропротекторным, противовоспалительным и противоаллергическим свойствам [22–26]. В настоящее время одними

из наиболее используемых источников для выделения розмариновой кислоты являются *Rosmarinus officinalis* L., *Ocimum basilicum* L., *Salvia officinalis* L., *Salvia miltiorrhiza* Bunge и *Mentha spiciata* L. [22]. Ряд исследований посвящен разработке методов получения розмариновой кислоты из растительного сырья, включая подходы биотехнологии и метаболической инженерии [27–29].

Первое биотехнологическое производство розмариновой кислоты было осуществлено с использованием суспензионной культуры *Coleus blumei* (*Lamiaceae*). Было достигнуто содержание розмариновой кислоты 13–15% от сухого веса [30]. Несмотря на весьма существенный выход, был проведен ряд опытов по его увеличению — эффективность продемонстрирована заменой глюкозы на сахарозу: 4% содер-

жание сахарозы в среде привело к увеличению выхода до 19%, а 5% – к рекордным 36% [31, 32]. Также существенный результат показывает добавление элиситоров, сверхэкспрессия различных ферментов, непрерывное культивирование в биореакторе (нежели периодическое или в шейкере-инкубаторе) [28].

Увеличение содержания целевого компонента (в данном случае розмариновой кислоты) относительно суммарного содержания БАВ в культуре *in vitro* даже при снижении его абсолютных значений, а также общее обеднение компонентного состава каллусов в сравнении с растительным сырьем позволяет предположить удешевление его выделения и очистки в промышленных масштабах. Значительной проблемой экстрагирования БАВ из интактных растений является невозможность получения индивидуального соединения с высоким выходом без дорогостоящих, высокотехнологичных либо достаточно длительных этапов тонкой очистки. В случае культур растительных клеток посредством подбора условий, питательных сред и стрессовых факторов (upstream-процессы), существует возможность многократно удешевить стадии downstream, чем решить одну из основных проблем промышленной переработки растительного сырья.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По итогам проведенных исследований был предложен состав питательной среды, обладающей наилучшими характеристиками для культивирования каллусной культуры лаванды узколистной как в лабораторной практике, с учетом выдающейся скорости роста культуры, так, в перспективе, и в промышленности. Из четырех исследованных сред наиболее высокие значения ростовых параметров и содержания розмариновой кислоты были получены на среде, содержащей 2.0 мг/л α -НУК и 0.1 мг/л БАП. Установлено, что световой режим не оказывает статистически значимого влияния на скорость роста и накопление фенольных соединений. Показана перспективность применения полученного штамма культуры лаванды узколистной для производства розмариновой кислоты. Масштабирование технологии требует дополнительных исследований, связанных с адаптацией штамма к суспензионному культивированию.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Popova E.V., Nosov A.V., Titova M.V., Kochkin D.V., Fomenkov A.A., Kulichenko I.E., Nosov A.M. Advanced biotechnologies: Collections of plant cell cultures as a basis for development and production of medicinal preparations // Russ. J. Plant. Physiol. 2021. V. 68. P. 385. <https://doi.org/10.1134/S102144372103016X>
2. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures // J. Med. Plants. Res. 2009. V. 3. P. 1222.
3. Kirimer N., Mokhtarzadeh S., Demirci B., Goger F., Khawar K.M., Demirci F. Phytochemical profiling of volatile components of *Lavandula angustifolia* Miller propagated under *in vitro* conditions // Ind. Crops Prod. 2017. V. 96. P. 120. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.061>
4. Woronuk G., Demissie Z., Rheault M., Mahmoud S. Biosynthesis and therapeutic properties of *Lavandula* essential oil constituents // Planta Med. 2011. V. 77. P. 7. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250136>
5. Stanciu G.A., Aonofriesei F., Lupsor S.I., Popescu A.N., Sirbu R.O. Study of phenolic compounds and antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* flowers macerates // Rev. de Chim. 2019. V. 70. P. 1800.
6. Adaszyńska-Skwirzyńska M., Dzieciotł M. Comparison of phenolic acids and flavonoids contents in various cultivars and parts of common lavender (*Lavandula angustifolia*) derived from Poland // Nat. Prod. Res. 2017. V. 31. P. 2575. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1320792>
7. Batiha G.E., Teibo J.O., Wasef L.G., Shaheen H.M., Akomolafe A.P., Teibo T.K., Al-kuraishy H.M., Al-Garbeeb A.I., Alexiou A., Papadakis M. A review of the bioactive components and pharmacological properties of *Lavandula* species // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 2023. V. 396. P. 877. <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02392-x>
8. Bouyahya A., Chamkhi I., El Menyiy N., El Mouden H., Harhar H., El Idrissi Z.L., Khouchlaa A., Jouadi I., El Baaboua A., Taha D., Balahbib A., Khalid A., Abdalla A.N., Zengin G., Simal-Gandara J., El Omari N. Traditional use, phytochemistry, toxicology, and pharmacological properties of *Lavandula dentata* L.: a comprehensive review // S. Afr. J. Bot. 2023. V. 154. P. 67. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.01.023>
9. Saeed F., Afzaal M., Raza M.A., Rasheed A., Husain M., Nayik G.A., Ansari M.J., 2023. Lavender essential oil: Nutritional, compositional, and therapeutic insights // Essential Oils / Eds. G.A. Nayik, M.J. Ansari. Cambridge: Academic Press, 2023. P. 85.
10. Yadikar N., Bobakulov K., Li G. Aisa H.A. Seven new phenolic compounds from *Lavandula angustifolia* // Phytochem. Lett. V. 23. P. 149. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.12.005>
11. Al-Bakhit A.A., Sawwan J.S. and Al-Mahmoud M.S. *In vitro* propagation of two *Lavandula* species: *Lavan-*

- dula angustifolia* and *Lavandula latifolia* L. *Medica* // Jordan J. *Agricult. Sci.* 2007. V. 3. P. 16.
12. Gonçalves S., Romano A. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula spp.*) and the production of secondary metabolites // *Biotechnol. Adv.* 2013. V. 31. P. 166. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.09.006>
 13. Пивоварова Н.С., Шебитченко Т.С., Некрасова Д.А., Данилова А.А., Бугаев А.С., Бронских Е.Д., Пovyдыш М.Н. Новые объекты в коллекции культур клеток высших растений Санкт-Петербургского Химико-Фармацевтического Университета // Сандеровские чтения. Сборник материалов конференции, посвященной памяти выдающегося отечественного ученого в области технологии лекарств Ю.К. Сандера / Под ред. Маймистова Д.Н. и др. Санкт-Петербург: СПХФУ, 2023. С. 198.
 14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473.
 15. Егорова Н.А. Изменчивость каллусных культур лаванды при длительном пассировании *in vitro* // Таврич. вестн. аграр. науки. 2017. Т. 1. С. 15.
 16. Якимова О.В. Морфогенез *in vitro* и клональное микроразмножение перспективных эфиромасличных растений семейства *Lamiaceae* – *Melissa officinalis* L. и *Origanum vulgare* L. Дисс. ... канд. биол. наук. Симферополь: ФГБУН “НИИСХ Крыма”, 2019. 192 с.
 17. Nishikawa K., Shimomura K., Kayano T., Yoshihira K., Ishimaru K., Flavonoids in Callus Cultures of *Scutellaria baicalensis* // *Japanese J. Food Chem. Saf.* 1996. V. 3. P. 35.
 18. Юрин В.М., Дитченко Т.И., Молчан О.В., Шанчиц М.П., Ромашко С.Н., Булатова А.А., Логвина А.О. Культура растительных клеток и тканей: технология получения, разнообразие фармакологически активных метаболитов и приемы регуляции их синтеза // Труды Белорус. гос. ун-та. 2009. Т. 4. С. 168.
 19. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1, М.: Мин-во здравоохранения, 2018. 1814 с.
 20. Lamuela-Raventós R.M. Folin–Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity: recent trends and applications // *Measurement of antioxidant activity & capacity* / Eds. R. Aрак, E. Capanoglu, F. Shahidi, Hoboken. John Wiley & Sons Ltd., 2018. P. 107. <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch6>
 21. Иванов П.А., Хабаров В.А. Изучение полифенольного комплекса культуры клеток лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* L.) // Молодая фармация – потенциал будущего: Сборник материалов XII всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием / Под ред. Д.Н. Маймистова. Санкт-Петербург: ФГБОУ ВО СПХФУ, 2022. С. 172.
 22. Marchev A.S., Vasileva L.V., Amirova K.M., Savova M.S., Koycheva I.K., Balcheva-Sivenova Z.P., Vasileva S.M., Georgiev M.I. Rosmarinic acid—from bench to valuable applications in food industry // *Trends Food Sci. Technol.* 2021. V. 117. P. 182. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.015>
 23. Stansbury J. Rosmarinic acid as a novel agent in the treatment of allergies and asthma // *J. Restor. Med.* 2014. V. 3. P. 121. <http://dx.doi.org/10.14200/jrm.2014.3.0109>
 24. Noor S., Mohammad T., Rub M. A., Raza A., Azum N., Yadav D.K., Hassan M.I., Asiri A.M. Biomedical features and therapeutic potential of rosmarinic acid // *Arch. Pharm. Res.* 2022. V. 45. P. 205. <https://doi.org/10.1007/s12272-022-01378-2>
 25. Ngo Y.L., Lau C.H., Chua L.S. Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential // *Food Chem. Toxicol.* 2018. V. 121. P. 687. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.064>
 26. Alagawany M., Abd El-Hack M.E., Farag M.R., Gopi M., Karthik K., Malik Y.S., Dhama K. Rosmarinic acid: modes of action, medicinal values and health benefits // *Anim. Health Res. Rev.* 2017. V. 18. P.167. <https://doi.org/10.1017/S1466252317000081>
 27. Khojasteh A., Mirjalili M.H., Hidalgo D., Corchete P., Palazon J. New trends in biotechnological production of rosmarinic acid // *Biotechnol. Lett.* 2014. V. 36. P. 2393. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1640-0>
 28. Kim G.D., Park Y.S., Jin Y.H., Park C.S. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. P. 2083. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6395-6>
 29. Khojasteh A., Mirjalili M.H., Alcalde M.A., Cusido R.M., Eibl R., Palazon J. Powerful plant antioxidants: A new biosustainable approach to the production of rosmarinic acid // *Antioxidants.* 2020. V. 9. P. 1273. <https://doi.org/10.3390/antiox9121273>
 30. Xu H., Kim Y.K., Jin X., Lee S.Y., Park S.U. Rosmarinic acid biosynthesis in callus and cell cultures of *Agastache rugosa* Kuntze // *J. Med. Plants Res.* 2008. V. 2. P. 237. <https://doi.org/10.5897/JMPR.9001095>
 31. Petersen M., Szabo E., Meinhard J., Karwatzki B., Gertlowski C., Kempin B., Fuß E. Biosynthesis and accumulation of rosmarinic acid in suspension cultures of *Coleus blumei* // *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 1995. V. 43. P. 89. <https://doi.org/10.1007/BF00052161>
 32. Hippolyte I., Marin B., Baccou J.C., Jonard R. Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. // *Plant Cell Rep.* 1992. V. 11 P. 109. <https://doi.org/10.1007/BF00232160>