الباب التاسع

المركبات الأيضية الثانوية فى النبات

أهمية المركبات الثانوية Secondary metabolites

هـى مركبات ثانوية By-products تنتج فى النبـات أثناء تمثيل المركبات الأيضية الأساسية التى لها أهميتها لنمو وتطور النبات مثل البروتينات والكربوهيدرات والدهون وغيرهـا . ومعظـم المركبات الثانوية قـد لا يكون لها أهمية فى نمـو النبات وتطوره. وهى مركبات بسـيطة أو متعددة ومختلفة فى تركيبهـا الكيميائى فمنها زيوت طيارة Volatile oil وقلويـدات Alkaloids وتربينـات Terpenoids وإسـترويدات Steroids وأنثوسـيانينات Anthocyanins وأنثراكوينونات Anthraquinones وفلافونات Flava-noids وجليكوزيـدات Glycosides وفينـولات Phenols ومركبات أليفاتية Aliphatic ومركبـات أخرى كثيرة. وهذه المركبات محدودة الانتشـار بين الأنـواع النباتية. فقد يحتوى نوع أو جنس نباتى دون غيره على مركب محدد أو عدة مركبات تكسبه صفة التميـز علـى غيره من النباتات. وقد ينحصر تواجد هذه المركبات فى عضو أو نسـيج معين دون غيره مثل الورقة والزهرة والثمرة والقلف والبذرة وغيرها. وقد يظهر تركيزها فـى مرحلة معينة من النمو. والمركبات الثانوية فى النبات لها أهمية كبيرة للإنسـان فى المجالات الطبية والصناعية مثل صناعة الأدوية Drugs ومكسـبات الطعم Flavors والعطـور Perfumes والصبغات Pigments وغيرها. وهذه المركبات غالبا ثابتة التركيب لا تتغـير ويصعب بناؤها داخل المعمـل. وأهميتها للنبات غير معروفة حتى الآن. وقد تكـون بعض هذه المركبات سـامة وحاميـة للنبات ضد أعدائه الحيوية. ويسـتخلص الإنسـان هذه المركبات لمقاومة الآفات. وتسـتخدم زراعة الأنسـجة لاستخلاص كثير من المنتجات الثانوية من الأنسـجة أو الأعضاء النباتية المنتجة والخازنة لها مباشـرة Endogenous. وتـزرع الخلايـا معلقة فى بيئة سـائلة فى مخمـرات كبيرة لاكثارها.

وتستخلص المركبات الثانوية على نطاق تجارى مباشرة من البيئة السائلة وتسمى Exogenous. ومنذ خمسينات القرن العشرين حدث تطور كبير فى إنتاج المخمرات والمعدات لاستخلاص المنتجات الثانوية من المزارع المعملية بكفاءة عالية جدا. وتستخدم هذه الأجهزة فى استخلاص العديد من المنتجات الطبية مثل استخلاص حمض Chlorogenic من نبات *Haplopappus* والفينولات Phenolics من نبات *Acer* والسربنتين Serpentine من نبات *Catharanthus* والنيكوتين Nicotine من نبات *Nicotiana*.

مكسبات الطعم

١- المجموعة الأولى

هى مجموعة من مكسبات الطعم موجودة بصورتها النهائية فى خلايا النبات Endogenous ومنها:

(أ) مكسبات طعم بسيطة Simple flavours

مركبات كيميائية ترتبط بها مجموعة واحدة صغيرة تكسبها صفة مميزة مكسبة للطعم مثل الكابسيسين Capsaicin فى الفلفل Capsicum وGingerols فى الزنجبيل Zingiber.

ب- مكسبات طعم معقدة Complex flavours

مركبات مختلفة فى تركيبها ورتبتها الكيميائية. فقد تكون زيوتا عطرية طيارة أو مركبات ثابتة تنتشر فى ثمار الفاكهة والخضر. وتشترك المركبات الموجودة فى ثمرة معينة فى إظهار الطعم والرائحة المميز لها (Van Straten, 1977).

٢- المجموعة الثانية

مركبات كيميائية ليست مكسبة للطعم، توجد فى خلايا النبات فى صورة بوادىء Precursors، تتحول إلى مركبات مكسبة للطعم أثناء المضغ أو التقطيع مثل

الثوم والبصل والكرنب حيث تتكون مركبات مكسبة للطعم نتيجة النشاط الإنزيمى على البوادىء الموجودة فى خلايا الثمرة. ففى البصل مثلا توجد مركبات S-methyl ; S-propyl ; S-trans-prop-1-enyl-L-cysteine sulphoxide مشتقة Derivatives من مركبات أخرى. وتعتبر بوادىء رئيسية غير طيارة. وخلال تمزق الخلية تتعرض هذه البوادىء لنشاط إنزيم Alliinase الذى يؤدى إلى إنتاج بوادىء سلفوأكسيد Sulphoxide precursors، وهذه بدورها تتحلل إنزيميا لتكون حمض سلفينيك Sul-phenic acid مع الأمونيا Ammonia ومركب Pyruvate. ويدخل حمض السلفينيك فى سلسلة من التفاعلات الكيميائية ينتج عنها مركبات عديدة متطايرة تحتوى على الكبريت ومكسبة للطعم. كذلك توجد منتجات ثانوية أخرى مكسبة للطعم مشتقة من مركبات داخل الخلية غير مكسبة للطعم. ويمكن الحصول عليها أثناء عملية التخمر Fermentation أو عمليات أخرى، ومن أمثلة ذلك المركبات المكسبة لطعم الكاكاو Cocoa والفانيليا Vanilla التى تظهر أثناء معالجة Curing الثمار والطعم المميز للبن Coffee الذى يظهر أثناء التحميص.

نظم إنتاج المركبات الأيضية فى المعمل

١-نظم الخلايا غير المتحركة Immobilized cell systems

وفيه تطمر الخلايا Embedded cells أو تصيد الخلايا Entrapped cells فى مادة جيلاتينية Gel أو فوم Foam، وتبقى ساكنة الحركة Immobilized وهى فى بيئة غذائية سائلة. وعند وصول الخلايا إلى ما بعد مرحلة أو مرحلتين من مراحل الثبات Stationary phase تستخلص المركبات الثانوية منها. والهدف من هذا النظام هو إنتاج مستمر أو نصف مستمر للمركبات الثانوية طبيعيا واستخلاصها بسهولة. ومن أمثلة ذلك استخلاص مادة الشيكونين Shikonin الحمراء تجاريا من نبات *Litho-spermum erythrorhizon*. حيث تزرع خلايا النبات فى مخمر كبير Fermentor يحتوى على بيئة غذائية خاصة بزراعة وإكثار (Propagation medium) الخلايا

بكمية كبيرة. ثم تنقل الخلايا إلى مخمر آخر يحتوى على بيئة جديدة تسمى بيئة إنتاج (Production medium). وثبت نجاح هذه الطريقة فى إنتاج مادة الكابسيسين Capsaicin من خلايا ثمار الفلفل *Capsicum frutescens*، ومادة الأنثراكوينون An-thraquinones من نبات *Morinda citrifolia*، ومادة Tropane alkaloids من نبات الداتورا *Datura innoxia*.

٢- نظم التحولات البيولوجية Biotransformation System

استخدمت زراعة الأنسجة لإنتاج مركبات أيضية ثانوية فى الخمسينات من القرن العشرين. وتتميز هذه الطريقة بإنتاج مركبات تحت ظروف معملية منضبطة ومعقمة بنظام التحولات البيولوجية، حيث يضاف إلى البيئة الغذائية واحد أو أكثر من البوادئ الكيميائية، فيتم تحويله إلى منتج جديد أكثر قيمة، ويستلزم لذلك توفير بعض الإنزيمات بجانب المكونات الأساسية البسيطة للبيئة الغذائية مثل السكروز والعناصر الغذائية لتمثيل منتج أكثر تعقيدا. وقد يستلزم إضافة أو استبعاد أحد المجموعات الكيميائية من أحد المركبات من خلال عمليات حيوية مثل Hydroxylation وGlycosylation وAcetylation و-Meth-ylation ومن أمثلة ذلك:

– استخلاص مركب Digitoxin من خلايا نبات الديجيتاليس (Foxyglove) *Digitalis lantana* المنزرعة فى بيئة سائلة. ثم تحويل مركب Digitoxin إلى مركب Digoxin المستخدم فى علاج أمراض القلب. وتتم هذه العملية بإضافة مجموعة هيدروكسيل لذرة الكربون رقم ١٢ وتسمى بعملية Hydroxylation.

– إنتاج قلويدات Alkaloids مثل مركب Scopolamine بزراعة خلايا نباتات *Hyoscyamus niger; Atropa bekIladonna*.

– إنتاج مركبات Anthocyanins من خلايا نباتات الجزر *Daucus carota* *Catharanthus roscus*.

– إنتاج مركب Anthraquinones من نبات *Morinda citrifolia*.

– إنتاج صبغة الشيكونين الحمراء Red pigment shikonin من نبات *Lithospermum erythrorhizon*.

– إنتاج مادة الكابسيسين Capsaicin من خلايا ثمار الفلفل *Capsicum frutescens*.

– إنتاج مركب Tropan alkaloids من خلايا نبات الداتورا *Datura innoxia*.

– إنتاج مركب النيكوتين المستخدم كمبيد حشرى من خلايا التبغ.

– إنتاج الفانيليا Vanillin من خلايا نبات الفانيليا بدلا من استخلاصها مباشرة من الثمار.

مواصفات الخلايا النباتية المستخدمة فى إنتاج مركبات ثانوية

– تتميز بوجود تعبير جينى متجانس Homogenous ثابت وراثيا يؤدى إلى إنتاج مرتفع.

– تتميز الخلايا بسرعة النمو والانقسام والنضج لأن فى ذلك زيادة إنتاج المركبات الثانوية.

– الخبرة المتميزة للباحث فى فصل وانتخاب الخلايا أو النسيج المنتج للمركبات الثانوية بدقة وتغيير اتجاه دورة التفاعل فى الوقت المناسب .

– الخبرة المتميزة للباحث فى تحديد موعد جمع المركبات الأيضية الثانوية، حيث إنه مرتبط بمرحلة ما بعد الانقسام Post-division phase أثناء دورة نمو الخلايا فى المعمل.

استخلاص بعض مكسبات الطعم فى المعمل

مازالت المعلومات المتوفرة حتى الآن عن مسار التفاعلات الكيميائية التى تؤدى إلى بناء كثير من المركبات الثانوية فى النبات محدودة. وهذا مؤكد بالنسبة

لمسار التفاعلات الخاصة بالمركبات الوسطية التى تؤدى إلى تكوين مكسبات الطعم، خصوصا إذا كانت تنتج فى خلايا أو عضو نباتى محدد من خلال تتابعات لبناء حيوى معبر عنه وراثيا، وهذا التعبير الوراثى مرتبط بفترة زمنية من السنة أو مرتبط بمرحلة معينة من نمو النبات. لذلك فمن المهم استخدام وسائل الهندسة الوراثية لنقل الجينات بهدف زيادة إنتاج مركبات اقتصادية محددة وخفض أو منع تكوين مركبات أخرى غير مرغوبة. ويجب أن تتميز الأجهزة الخاصة بزراعة الأنسجة بالكفاءة الذاتية لقياس سرعة نمو الخلايا والتحكم فى سرعتها وإنتاج مركبات مستهدفة. كما يجب أن تكون الأجهزة مزودة بوسائل إيقاف التمثيل البنائى فى الوقت المناسب وإجراء التجارب فى أية فترة من السنة وتحقق معدلا عاليا من الإنتاج. وتعتبر هذه النوعية من النظم وسائل جيدة لاستخلاص الإنزيمات والتعرف على المسار الكامل لتمثيل بعض المواد مثل مادة Berberine الموجودة فى نبات Berberis ونبات Coptis. وأجريت دراسات عديدة على أنواع مختلفة من مزارع الأنسجة النباتية والكالس ومعلق الخلايا ومزارع الخلايا غير المتحركة لإنتاج مركبات مكسبة للطعم (Hong and Harlander, 1989). ومن أمثلة ذلك:

١- الكابسيسين Capsaicin

يستخرج الكابسيسين من ثمار الفلفل التابعة للنوع *Capsicum frutescens* ويعرف تجاريا بالشطة الأفريقى African chilies وثمار النوع *Capsicum annum* ويعرف تجاريا بفلفل تاباسكو Tabasco. وتعرف هذه الشطة بأسماء تجارية أخرى مثل الشطة السودانى أو شطيطة أو فلفل أحمر. وتعتبر أمريكا الوسطى وأمريكا الجنوبية هى الموطن الأصلى لنبات الشطة. وتزرع بنجاح فى الوطن العربى وخاصة السودان والثمار هى قرون صغيرة خضراء اللون فى المرحلة الأولى من نموها ثم تتلون باللون الأحمر عند نضجها، وطعمها حريف جدا. والثمار الناضجة الحمراء الجافة هى المستعملة طبيا. وتحتوى ثمار الشطة على قلويد الكابسيسين Capsaicin بنسبة

٠,٠٢٪ وهى المادة الحريفة الرئيسية فى ثمار الفلفل. وكان إنتاج مادة الكابسيسين منخفضا قبل تواجد المخمر الحيوى Biofermentor الذى كان سببا فى ارتفاع نسبة الاستخلاص إلى١٠٠٪. وساعد على ذلك انتخاب سلالات من الفلفل تتميز بارتفاع محتواها من الكابسيسين، واستخدام نظام معلق خلايا غير متحركة، وتوفير الظروف البيئية المحيطة المناسبة للاستخلاص. وتوضع الخلايا فى كيس شبكى من حبيبات بولى يوريثان فوم Reticulated Polyurethane Particles Foam. وبإضافة مركب Isocarpic acid– أحد البوادىء Precursors المنتجة للكابسيسين مباشرة– إلى البيئة الغذائية السائلة تم الحصول على مزيد من الإنتاج. وكان أعلى معدل إنتاج هو ٠,٥ ملليجرام Capsaisin/ جرام مادة جافة/ يوم. كما زاد إنتاجية هذه المزارع باستخدام مراقد غير متحركة لخلايا الفلفل مصنوعة من جسيمات فوم ورقية Sta-tionary foam particles.

٢- الفانيلين Vanillin

نبات الفانيليا *Vanilla planifolia* معروفة بالفانيليا المكسيكى Mexican va-nilla. وهى من نباتات المناطق الحارة. ويسمى فى المكسيك وجاميكا بالخروب العطرى. وتزرع الفانيليا للحصول على ثماره. وهى قرون رفيعة اسطوانية. طول القرن حوالى٢٠ سم. القرون الخضراء يتحول لونها عند النضج إلى الأصفر، وبعد معالجتها Curing صناعيا تتحول إلى البنى القاتم. وتبدأ المعالجة بجمع القرون الخضراء مكتملة النمو وقبل اكتمال نضجها. ثم تجفف لتتكون بها مادة الفانيلين. وتحتوى القرون الخضراء على مواد جلوكوزيدية أهمها جلوكوفانيلين Glucovanil-lin المعرفة باسم أفينين Avenein وكحول Glucovanillic alcohol. وأثناء المعالجة يتحلل الجلوكوفانيلين بفعل الإنزيمات إلى جلوكوز ومادة الفانيلين. ويتحلل Glu-covanillic بفعل الإنزيمات إلى جلوكوز وكحول الفانيليك Vanillic، ويتحلل كحول الفانيليك بعد ذلك إلى مادة الفانيلين.

ومعالجة قرون الفانيليا خطوة هامة لاكتمال تكوين مادة الفانيلين Vanillin فيها وإعدادها للتسويق. وتختلف طرق المعالجة باختلاف منطقة زراعة الفانيليا. وتجرى المعالجة بإحدى الطرق الآتية:

١- تعرض الثمار للشمس حتى تجف، ثم تحفظ بعد تجفيفها بين طبقات من البطاطين الصوف، ثم تعرض للشمس عدة أيام حتى يتم معالجتها واكتمال لونها وتكوين مادة الفانيلين.

٢- تعرض الثمار لغاز الإيثلين Ethylene فى حجرات خاصة لفترة زمنية لمعالجتها وتكوين مادة الفانيلين.

٣- تغمس القرون لعدة ثوانٍ فى ماء مغلى، وتكرر ٢- ٣ مرات، ثم تجفف فى أفران ثم تحفظ بين طبقات من بطاطين صوف داخل حجرات حتى تتم المعالجة وتكوين مادة الفانيليا. وهذه طريقة تعطى نتائج أفضل.

استخلاص مادة الفانيلين Vanillin

مادة الفانيلين المكسبة للطعم هى بللورات بيضاء لها رائحة وطعم قرون الفانيليا الجافة. وتخلق هذه المادة فى خلايا القرن من بوادىء جلوكوزيدية Glycosidic precursors فى وجود إنزيم B- glycosidase أثناء عملية المعالجة. وبالرغم من أن مركب الفانيلين Vanillin هو المكون الأساسى لمادة الفانيليا، إلا أن عملية التخمر تؤدى إلى إنتاج مركبات أخرى تتواجد بتركيزات مختلفة وتتميز بتفوقها العالى فى طعم ورائحة الفانيليا Vanilla الطبيعى نفسه. وقد أدخلت تحسينات فى مزارع معلق خلايا نبات الفانيليا للحصول على أعلى إنتاج لها وهو ٣٨٣ ميكروجرام/ لتر/ يوم، ويظهر المركب المنتج فى معلق الخلايا فى صورة فينول حر أكثر من أن يكون Glycoside. كذلك أدخل تطور آخر حيث أضيف للبيئة الغذائية الخاصة بأنسجة نبات الفانيليا بادىء يسمى Ferulic acid يشجع إنتاج مادة الفانيلين. وأثبتت التجارب السابقة فى عدم تجمع مركبات فينولية مكسبة للطعم فى مزارع الخلايا

المعلقة لنبات الفانيليا مالم تظهر مع مركب Chitosan الذى يعمل على تجمع حمض الفانيليك Vanilic acid أكثر من الفانيلين Vanilin. وقد ثبت أن مركب Isoferulic acid هو البادىء لحمض الفانيليك Vanillic acid. ونظرا لارتفاع سعر الفانيلين فقد أمكن تحضيرها من مصادر أخرى منها مادة كونيفرين Coniferin الموجودة فى جذوع بعض أنواع أشجار الصنوبر. وتحضر أيضا من اللجنين Legnin الموجود فى لب الخشب وهو ناتج ثانوى من صناعة الورق. كما يمكن تحضير مادة الفانيلين من مادة إجينول Eugenol وهى مادة فينولية موجودة فى زيت القرنفل.

٣ – المواد المكسبة للطعم فى البصل والثوم

يظهر الطعم المميز للبصل والثوم نتيجة تأثير إنزيم الأليناز Alliinase على بوادىء وسطية ناتجة من تحلل إنزيمى لمركب S- alkyl- cysteine sulphoxide. ولذلك يستلزم وجود هذا المركب مع إنزيم الأليناز فى مزارع الخلايا للحصول على أفضل النتائج. ومن خلال مزارع الخلايا المعلقة للبصل أمكن تنشيط الخلايا بتغذيتها على بوادىء مكسبات الطعم وفى وجود إنزيم الأليناز فى البيئة الغذائية. وثبت بالتجربة أن مركب ^{14}C-labelled S- (2- carboxypropyl)- L- Cysteine هو البادىء لمركب S- trans prop- 1-enyl- L- cysteine، والمركب الأخير هو بادىء أيضا. ومضمون هذه التجربة أن مسارات التفاعل المذكورة يتم التعبير عنها حتى فى الزراعات المعملية غير القادرة للوصول إلى الطعم النهائى المميز للبصل. وثبت أن المستويات المنخفضة (٠,٥ ملليجرام/ لتر) من منظم النمو Picloram فى البيئة الغذائية لنمو كالس البصل أدى إلى تنشيط تراكم المركب S- trans prop- 1-enyl- L- cysteine sulphoxide للوصول إلى مستوى ٤٠٪ من التركيز الموجود فى البصل. وهذه المزروعات الخلوية لها القدرة على إنتاج مركبات مميزة لطعم البصل لأن لها القدرة على تكوين كل البوادىء الأساسية له (Musker, et al. 1988). كذلك ثبت أن المستويات المنخفضة من منظم النمو Picloram فى البيئة الغذائية تنشط تكوين

الجذور ونمو البراعم الخاصة بالنموات الخضرية، بينما المستويات المرتفعة من هذا الهرمون تؤدى إلى تكوين بادىء السلفوكسيد Sulphoxide precursor بدون حدوث تكشفات للبراعم والجذور. وعلى ذلك فليس من الضرورى الربط بين العمليتين (Col-lin et al. 1989).

٤ – زيت النعناع Mint essential oil

مزارع الكالس لخلايا النعناع *Mentha piperita* عادة منخفضة فى إنتاجيتها من زيت النعناع. وهو زيت ترتفع فيه نسبة كل من مادتى Menthofuran; Pulegone بالمقارنة بنبات الأم الذى يحتوى على نسبة مرتفعة من الزيت الكلى الذى يسود فيه مادتا Menthone; Menthol. كذلك ثبت وجود تربينات أحادية Monoterpenes فى مزارع السلالات الخلوية Cell lines للنعناع بنسب صغيرة ووحيدة ضمن مكونات الزيت الطيار بالإضافة إلى كميات شحيحة من مركبات Neomenthol; Menthone Neomenthyl acetate;. ولا توجد خلايا تحتوى على Menthol. ويعزى عدم تجمع التربينات الأحادية فى خلايا النعناع إلى سرعة تحللها أكثر من بنائها فى الخلية لأنها مركبات سامة Phyto- toxic متجمعة ومعزولة خارج الخلايا فى مكان بين جدار الخلية وكيوتيكل الخلايا المفرزة للغدد الزيتية. وفى زراعة الأنسجة لايوجد فاصل فيزيقى بين بناء وتخزين التربينات الأحادية ولا توجد وسائل تحمى التربينات من التحلل المباشر وهى فى بداية نشأتها. كما ثبت أن زراعة الخلايا على بيئة غذائية ثنائية المظهر Two phase systems مفيدة فى تشجيع تراكم التربينات من بعض الأنواع النباتية. وأن المركبات المحبة للدهون Lipophilic مثل الجليسريدات الثلاثية ومنها مركب Myglyol مفيدة لادمصاص وتنظيم التربينات الأحادية المفروزة فى البيئة الغذائية للخلايا. ويمكن القول بأن وجود مركبات الادمصاص غير القطبية Non- polar adsorbents له أهميتها لتتبع تراكم التربينات الأحادية. وبالرغم من النجاح المحدود فى مزارع خلايا كالس النعناع غير المتكشف، إلا أن كالس نوع النعناع *M. piperita* المتكشف أعطى نموات خضرية وأنتج كميات معنوية من التربينات الأحادية الطبيعية.

٥ – مكسبات طعم الفاكهة Fruit flavours

توجد مركبات معقدة مكسبة لطعم الفاكهة أهمها مكسبات طعم الفراولة والموانح. ويستخدم مكسب طعم الفراولة على نطاق واسع فى الصناعات الغذائية. وحدث تطور محدود فى زراعة الأنسجة للحصول على طعم الفراولة (Hong, and Har-lander, 1989). ويشترك حوالى ٢٠٠ مركب فى إظهار طعم الفراولة منها إسترات Esters وكيتونات Ketones وكحولات Alcohols وأحماض عضوية Organic acids ولاكتونات Lactoes والفيورانات Furans. ومكسبات طعم الجوافة من المركبات الهامة والمعقدة. وفى دراسة تحليلية لكالس ناتج من خلايا ثمار الجوافة استخدم فيها جهاز Gas chromatogrqaphy (GC) تم التعرف إلى ١٩ مركبا متطايرا من ٥٨ مركبا موجودة أصلا فى ثمار الجوافة.

□□□