

Figure. Plasmid constructs encoding the enzymes involved in indigo synthesis. A: Plasmid pD2643-20 carries a Trp operon with altered regulatory elements to enhance synthesis rates. The *trpB* gene on this plasmid contains an additional mutation at position 379 that causes indole, rather than tryptophan, to be produced. B: Plasmid pFD911A bears the four genes encoding the naphthalene dioxygenase enzyme system. A P_L promoter has been introduced to direct overexpression of the genes, and an extra ferredoxin gene has been inserted at the front of the operon to enhance the activity and stability of the enzyme complex.

duction of the appropriate promoter resulted in high levels of indole synthesis and naphthalene dioxygenase activity in the respective cultures [13]. *E. coli* strain FM5 containing both plasmids, after simultaneous induction of the two promoter systems, synthesized indigo at a rate of 0.5–1 g/h/l of growth medium. The indigo was primarily secreted out of the cells into the culture fluid, and precipitated as a dark blue solid. Under most conditions of indigo synthesis, indole accumulation could not be detected.

4. Summary

The results presented here suggest that it is feasible to manipulate the genetic makeup of disparate metabolic pathways in bacterial cells so that new products are formed, possibly in useful quantities. In this case, the output of one altered biosynthetic pathway became *in vivo* the substrate for an unrelated, normally degradative pathway that completed the synthesis of a novel (to the bacterial host) material. In addition to the textile dye used in the

present example, biological processes for the manufacture of vitamins, amino acids, chiral intermediates, antibiotics, polymers and other specialty chemicals can be enhanced by this approach. Efforts directed towards the commercial exploitation of specialty and complex chemicals produced through microbial fermentation offer the potential for economically and environmentally improved synthetic processes.

- [1] P.H. Gray, *Proc. R. Soc. London [Ser.] B* **1927**, *102*, 263.
- [2] T. Oshima, S. Kawai, F. Egami, *J. Biochem.* **1965**, *58*, 259.
- [3] B.D. Ensley, B.J. Ratzkin, T.D. Osllund, M.J. Simon, L.P. Wackett, D.T. Gibson, *Science* **1983**, *222*, 167.
- [4] C. Yanofsky, I.P. Crawford, 'The Enzymes', Academic Press, New York, 1972.
- [5] D.E. Tribe, J. Pittard, *Appl. Environ. Microbiol.* **1979**, *36*, 181.
- [6] M.P. Starr, W. Blau, G. Kossens, *Biochem. Z.* **1960**, *333*, 334.
- [7] T. Oshiman, S. Kwai, F. Egami, *J. Biochem.* **1965**, *58*, 259.
- [8] B. Ensley, D.T. Gibson, *J. Bacteriol.* **1983**, *155*, 505.
- [9] J. Fieshko, T. Rich, *Chem. Eng. Commun.* **1985**, *45*, 229.
- [10] D. Mascarenhas, Int. Pat. 1987, WO87/01130.
- [11] M.H. Caruthers, 'Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments', Verlag Chemie, Weinheim, 1982.
- [12] T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook, 'Molecular Cloning, A Laboratory Manual', Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- [13] D. Murdock, B. Ensley, C. Serdar, M. Thalen, *Bio/Technol.* **1993**, *11*, 381.

Chimia 48 (1994) 492–493
© Neue Schweizerische Chemische Gesellschaft
ISSN 0009–4293

Neue Chromogene mit verdrillten π -Elektronensystemen – Über Indigo und 'Überindigo'

Albert Beck, Rudolf Gompper*, Karsten Hartmann und Kazufumi Yokogawa

Die hohen Energiebarrieren der (*Z/E*)-Isomerisierung von Ethylen-Derivaten können grundsätzlich durch eine Stabilisierung des Übergangszustandes oder durch eine Destabilisierung des Grundzu-

standes, z.B. hervorgerufen durch eine gegenseitige Behinderung voluminöser Substituenten, erniedrigt werden. Die sterische Überfüllung an der (*C=C*)-Bindung lässt sich durch *syn*- oder *anti*-Pyramida-

lisierung der C-Atome ('folding') und/oder eine Verdrillung ('twisting') um die Verbindungachse der olefinischen C-Atome vermindern. Der Energieinhalt der Moleküle steigt mit abnehmender Überlappung der p_z -Orbitale und der HOMO-LUMO-Abstand wird kleiner (Bathochromie) (vgl. [1]).

Es ist unser Ziel, verdrillte und gefaltete Ethylenderivate zu synthetisieren, die

*Korrespondenz: Prof. Dr. R. Gompper
Institut für Organische Chemie
Universität München
Karlstrasse 23
D-80333 München

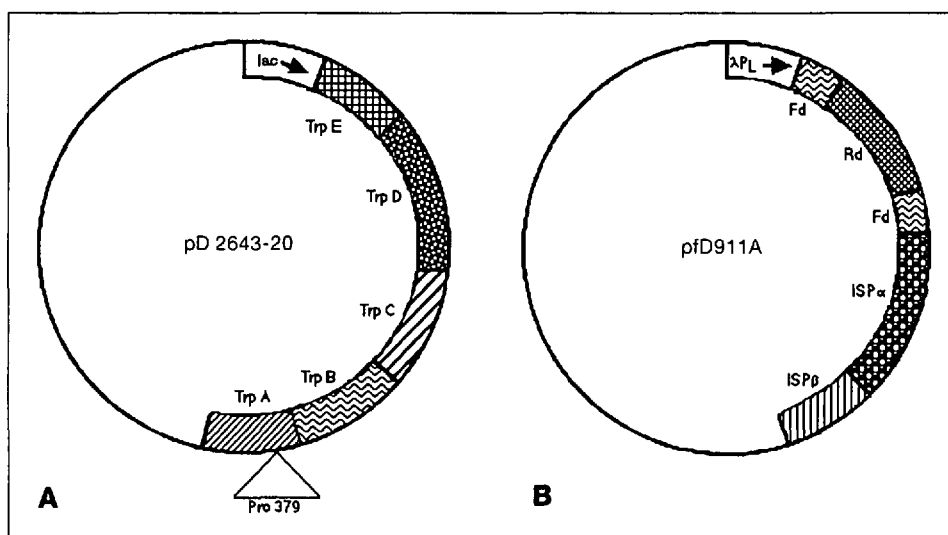


Figure. Plasmid constructs encoding the enzymes involved in indigo synthesis. A: Plasmid pD2643-20 carries a Trp operon with altered regulatory elements to enhance synthesis rates. The *trpB* gene on this plasmid contains an additional mutation at position 379 that causes indole, rather than tryptophan, to be produced. B: Plasmid pFD911A bears the four genes encoding the naphthalene dioxygenase enzyme system. A λ PL promoter has been introduced to direct overexpression of the genes, and an extra ferredoxin gene has been inserted at the front of the operon to enhance the activity and stability of the enzyme complex.

duction of the appropriate promoter resulted in high levels of indole synthesis and naphthalene dioxygenase activity in the respective cultures [13]. *E. coli* strain FM5 containing both plasmids, after simultaneous induction of the two promoter systems, synthesized indigo at a rate of 0.5–1 g/h/l of growth medium. The indigo was primarily secreted out of the cells into the culture fluid, and precipitated as a dark blue solid. Under most conditions of indigo synthesis, indole accumulation could not be detected.

4. Summary

The results presented here suggest that it is feasible to manipulate the genetic makeup of disparate metabolic pathways in bacterial cells so that new products are formed, possibly in useful quantities. In this case, the output of one altered biosynthetic pathway became *in vivo* the substrate for an unrelated, normally degradative pathway that completed the synthesis of a novel (to the bacterial host) material. In addition to the textile dye used in the

present example, biological processes for the manufacture of vitamins, amino acids, chiral intermediates, antibiotics, polymers and other specialty chemicals can be enhanced by this approach. Efforts directed towards the commercial exploitation of specialty and complex chemicals produced through microbial fermentation offer the potential for economically and environmentally improved synthetic processes.

- [1] P.H. Gray, *Proc. R. Soc. London [Ser.] B* **1927**, 102, 263.
- [2] T. Oshima, S. Kawai, F. Egami, *J. Biochem.* **1965**, 58, 259.
- [3] B.D. Ensley, B.J. Ratzkin, T.D. Osllund, M.J. Simon, L.P. Wackett, D.T. Gibson, *Science* **1983**, 222, 167.
- [4] C. Yanofsky, I.P. Crawford, 'The Enzymes', Academic Press, New York, 1972.
- [5] D.E. Tribe, J. Pittard, *Appl. Environ. Microbiol.* **1979**, 36, 181.
- [6] M.P. Starr, W. Blau, G. Kossens, *Biochem. Z.* **1960**, 333, 334.
- [7] T. Oshiman, S. Kwai, F. Egami, *J. Biochem.* **1965**, 58, 259.
- [8] B. Ensley, D.T. Gibson, *J. Bacteriol.* **1983**, 155, 505.
- [9] J. Fieshko, T. Rich, *Chem. Eng. Commun.* **1985**, 45, 229.
- [10] D. Mascarenhas, Int. Pat. 1987, WO87/01130.
- [11] M.H. Caruthers, 'Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments', Verlag Chemie, Weinheim, 1982.
- [12] T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook, 'Molecular Cloning, A Laboratory Manual', Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- [13] D. Murdock, B. Ensley, C. Serdar, M. Thalen, *BioTechnol.* **1993**, 11, 381.

Chimia 48 (1994) 492–493
© Neue Schweizerische Chemische Gesellschaft
ISSN 0009–4293

Neue Chromogene mit verdrillten π -Elektronensystemen – Über Indigo und 'Überindigo'

Albert Beck, Rudolf Gompper*, Karsten Hartmann und Kazufumi Yokogawa

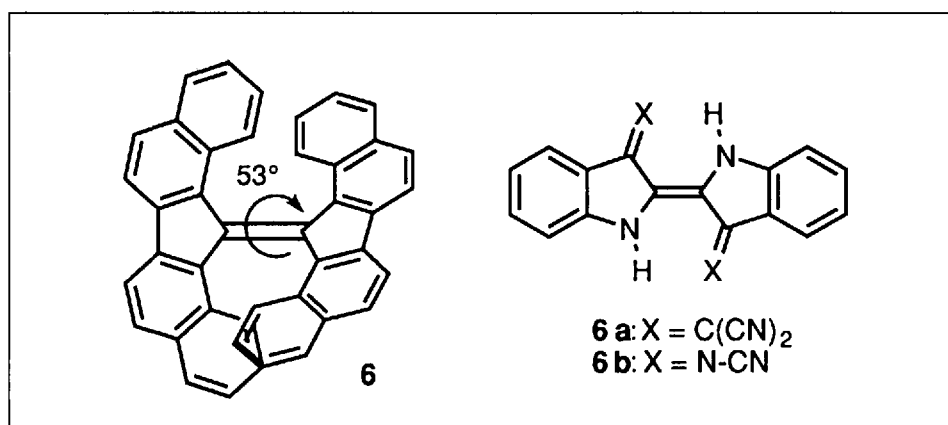
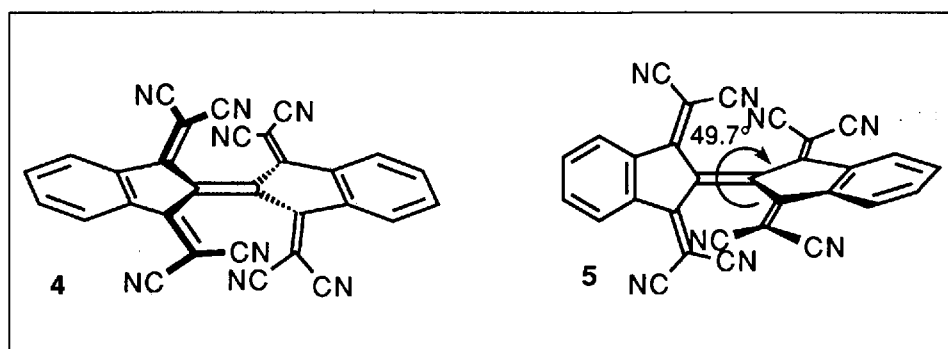
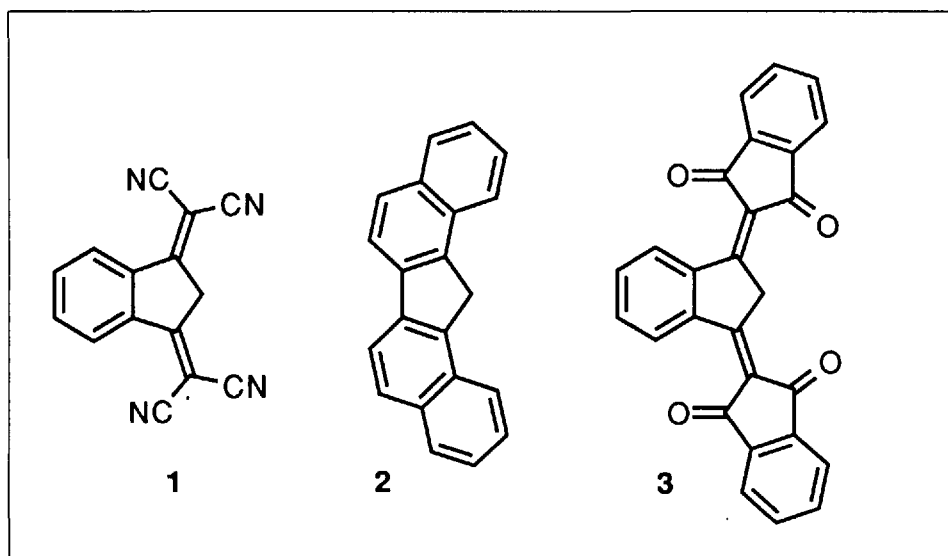
Die hohen Energiebarrieren der (*Z/E*)-Isomerisierung von Ethylen-Derivaten können grundsätzlich durch eine Stabilisierung des Übergangszustandes oder durch eine Destabilisierung des Grundzu-

standes, z.B. hervorgerufen durch eine gegenseitige Behinderung voluminöser Substituenten, erniedrigt werden. Die sterische Überfüllung an der (*C=C*)-Bindung lässt sich durch *syn*- oder *anti*-Pyramida-

lisierung der C-Atome ('folding') und/oder eine Verdrillung ('twisting') um die Verbindungachse der olefinischen C-Atome vermindern. Der Energieinhalt der Moleküle steigt mit abnehmender Überlappung der p_z -Orbitale und der HOMO-LUMO-Abstand wird kleiner (Bathochromie) (vgl. [1]).

Es ist unser Ziel, verdrillte und gefaltete Ethylenderivate zu synthetisieren, die

*Korrespondenz: Prof. Dr. R. Gompper
Institut für Organische Chemie
Universität München
Karlstrasse 23
D-80333 München



funktionelle Gruppen enthalten, insbesondere chromophore Gruppen. Mit Hilfe der Elektronenspektren kann man so eine Änderung der Geometrie der C=C-Bindungen leicht erkennen und dies auch in den Fällen, in denen Röntgen-Strukturanalysen nicht durchführbar sind. Darüber hinaus lassen sich Aussagen über die Situation in Lösung im Vergleich zu der im festen Zustand machen.

Bezüglich der bathochromen Verschiebung des längstwelligsten Absorptionsmaximums von Ethylenderivaten durch Verdrillung oder Faltung finden sich nur wenige Daten in der Literatur. Die Ther-

mochromie des Bianthrone ist z.B. lange bekannt und wird auf den Übergang einer gefalteten in eine verdrillte Form zurückgeführt [2], *N,N'*-Dialkylindigos absorbieren mit zunehmender Raumerfüllung der Alkylgruppen längerwellig als der Grundkörper [3]. Quantenmechanische Rechnungen am Beispiel des Fulvalens sagen voraus, dass die durch Verdrillung verursachte Bathochromie von einer Abnahme der Bandenintensität begleitet ist [4].

Die Synthese von verdrillten Ethylenderivaten könnte nicht nur einen Beitrag zum Verständnis des Zusammenhanges

zwischen Verdrillung/Faltung und Farbe von Ethylenderivaten liefern; es könnten dabei evtl. auch Farbstoffe gewonnen werden, die im nahen Infrarot absorbieren und z.B. für Halbleiter-Laser geeignet sind [5].

Für die Einführung sterisch anspruchsvoller Chromophore haben wir als Ausgangsmaterialien u.a. 1,3-Bis(dicyanomethyl)indan (1), Dibenzofluoren (2) und 'Triindon' (3) als Ausgangsmaterialien gewählt. Aus 1 sind mit donorstabilisierten Benzaldehyden oder *p*-Nitrosodialkylanilinen schon tieffarbige Merocyanine hergestellt worden [6]. Die Molekülgeometrien dieser Substanzen sind allerdings unbekannt.

Das Indan 1 reagiert mit dem daraus hergestellten Dibromo-Derivat in Gegenwart von Hünig-Base zu dem gelben 'Dimer' 4 (λ_{\max} (CH₂Cl₂) = 405 nm), das schwach *anti*-pyramidalisiert vorliegt; 4 wandelt sich beim Stehen in Acetonitril langsam in das stark verdrillte Isomer 5 um (λ_{\max} (MeCN) = 510 nm) [1].

Noch stärker verdrillt als 5 ist 6 (Synthese vgl. [7]). Verdrillungseffekte könnten auch an der langwelligen Absorption der Indigoabkömmlinge 6a (λ_{\max} (DMSO) = 746 nm) und 6b (λ_{\max} (DMSO) = 751 nm) beteiligt sein.

- [1] A. Beck, R. Gompper, K. Polborn, H.-U. Wagner, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1424; *ibid. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1352.
- [2] E. Harnik, G.M.J. Schmidt, *J. Chem. Soc.* **1954**, 3295.
- [3] G. Miehe, P. Susse, V. Kupcik, E. Egert, M. Nieger, G. Kunz, R. Gerke, B. Knieriem, M. Niemeyer, W. Lüttke, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1008; *ibid. Int. Ed.* **1991**, *30*, 964.
- [4] A.Y. Meyer, H. Yinnon, *Tetrahedron* **1972**, *28*, 3915.
- [5] J. Fabian, R. Zahradnik, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 693; *ibid. Int. Ed.* **1989**, *28*, 677.
- [6] K.A. Bello, L. Cheng, J. Griffiths, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1987**, 815.
- [7] O.I. Magidson, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1925**, *58*, 433; V. Franzen, H.-I. Joschek, *Liebigs Ann. Chem.* **1961**, *648*, 63.