

beendet, sobald die Temperatur auf 170–175 °C (nach 30–40 h) gefallen ist. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird das transparente Kolloid mit dem vierfachen Volumen an Methanol versetzt, woraufhin die Nanokristalle ausfallen. Diese werden abzentrifugiert, mit Methanol gewaschen und getrocknet (Ausbeute: 10.8 g, 89 %).

Um transparente und streufreie Kolloidlösungen zu erhalten, werden 50 mg des Pulvers entweder in 5 mL *N,N*-Dimethylformamid bei 100 °C oder in 5 mL Methanol, das einige Tropfen einer Lösung von Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (25 Gew.-%) in Methanol enthält, redispersiert. Vor den spektroskopischen Messungen wurden beide Lösungen mit Methanol oder 2-Propanol um den Faktor 50 verdünnt.

Zur Bestimmung der Quantenausbeute bei Raumtemperatur wurde die Emission der Kolloidlösung mit derjenigen einer Lösung von Rhodamin 6G (Lambda Physics, laser grade; in spektroskopisch reinem Ethanol) verglichen, wobei die beiden Lösungen identische optische Dichten bei der Anregungswellenlänge aufwiesen.

Eingegangen am 2. Mai  
veränderter Fassung am 17. Oktober 2000 [Z 15056]

## Synthese funktionalisierter Cyclohexadien-*trans*-dirole durch rekombinante *Escherichia coli*-Zellen\*\*

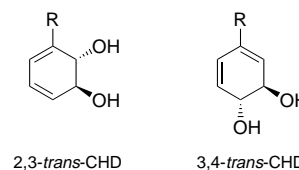
Dirk Franke, Georg A. Sprenger und Michael Müller\*

Durch Ganzzellbiotransformation produzierte funktionalisierte Cyclohexadien-*cis*-dirole (*cis*-CHD) haben sich in der organischen Synthese als äußerst wertvolle Ausgangssubstanzen zur Herstellung zahlreicher Natur- und Wirkstoffe erwiesen.<sup>[1]</sup> Ausgehend von *cis*-CHD sind z. B. Synthesen zu Conduritol,<sup>[2]</sup> Zeylena<sup>[3]</sup> und *ent*-Morphinan<sup>[4]</sup> erarbeitet worden.

Am Diensystem substituierte Cyclohexadiendirole mit *trans*-ständiger Glycoleinheit (*trans*-CHD) haben sich dagegen bislang nicht als chirale Synthesebausteine etablieren können. Grund hierfür ist die bislang schlechte Verfügbarkeit dieser Verbindungen. Zum einen können durch die Dioxygenase-katalysierte Dihydroxylierung von Arenen keine *trans*-Diol-Einheiten aufgebaut werden, während die Epoxidierung durch eine Monooxygenase und die nachfolgende nucleophile Öffnung in aller Regel racemische Produkte liefern. Zum anderen sind alle chemischen Routen zu *trans*-CHD durch geringe Enantioselektivität sowie aufwändige Synthesefolgen gekennzeichnet.<sup>[5, 6]</sup> Versuche verschiedener Arbeitsgruppen, *trans*-CHD direkt aus *cis*-CHD herzustellen, waren ebenfalls durch geringen Erfolg in Bezug auf die Gesamtausbeuten gekennzeichnet.<sup>[3, 7]</sup>

Gleichwohl konnte gezeigt werden, dass *trans*-CHD und insbesondere Derivate von *trans*-2,3-Dihydroxy-2,3-dihydrobenzoesäure ideale Ausgangsverbindungen zur Herstellung von Aminocarbazuckern (z. B. Valienamin)<sup>[5b]</sup> und natürlichen Cyclohexanbisepoxiden (z. B. Crotepoxid)<sup>[8]</sup> sind.

*trans*-CHDs kommen aber auch als Folgemetabolite des Shikimatbiosyntheseweges in Bakterien, Pflanzen und Pilzen vor und sind damit prinzipiell durch Eingriffe in deren Metabolismus (metabolic engineering) zugänglich. So konnten Frost et al. beispielsweise Shikimisäure und Chinasäure



- [1] a) C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8706; b) T. J. Trentler, T. E. Denler, J. F. Bertone, A. Agrawal, V. L. Colvin, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1613; c) O. I. Micic, C. J. Curtis, K. K. Jones, J. R. Sprague, A. J. Nozik, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 4966; d) A. A. Guzelian, J. E. B. Katari, A. V. Kadavanich, U. Banin, K. Hamad, E. Juban, A. P. Alivisatos, R. H. Wolters, C. C. Arnold, J. R. Heath, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 7212; e) A. A. Guzelian, U. Banin, A. V. Kadavanich, X. Peng, A. P. Alivisatos, *Appl. Phys. Lett.* **1996**, *69*, 1432; f) M. A. Hines, P. Guyot-Sionnest, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3655; g) J. Rockenberger, E. C. Scher, A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11596; h) K. Riwozki, H. Meyssamy, A. Kornowski, M. Haase, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 2824.
- [2] X. Peng, J. Wickham, A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5343.
- [3] G. Blasse, B. C. Grabmaier, *Luminescent Materials*, Springer, Berlin, **1994**.
- [4] N. Hashimoto, Y. Takada, K. Sato, S. Ibuki, *J. Lumin.* **1991**, *48–49*, 893.
- [5] B. M. J. Smets, *Mater. Chem. Phys.* **1987**, *16*, 283.
- [6] a) M. Bruchez, Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* **1998**, *281*, 2013; b) W. C. W. Chan, S. Nie, *Science* **1998**, *281*, 2016.
- [7] a) V. L. Colvin, M. C. Schlamp, A. P. Alivisatos, *Nature* **1994**, *370*, 354; b) B. O. Daboussi, M. G. Bawendi, O. Onitsuka, M. F. Rubner, *Appl. Phys. Lett.* **1995**, *66*, 1316; c) Y. Yang, J. Huang, S. Liu, J. Shen, *J. Mater. Chem.* **1997**, *7*, 131; d) M. C. Schlamp, X. Peng, A. P. Alivisatos, *J. Appl. Phys.* **1997**, *82*, 5837.
- [8] X. Peng, J. Wickham, A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5343.
- [9] a) R. X. Fischer, C. Lengauer, E. Tillmanns, R. J. Ensink, C. A. Reiss, E. J. Fantner, *Mater. Sci. Forum* **1993**, *133–136*, 287; b) R. A. Young, *The Rietveld Method*, Oxford University Press, Oxford, **1993**.
- [10] a) O. Glatter, *J. Appl. Crystallogr.* **1980**, *13*, 7; b) O. Glatter, *Acta Phys. Austriaca* **1977**, *47*, 83; c) O. Glatter, *J. Appl. Crystallogr.* **1977**, *10*, 415.
- [11] J.-C. Bourcet, F. K. Fong, *J. Chem. Phys.* **1974**, *60*, 34.
- [12] W. van Schaik, S. Lizzo, W. Smit, G. Blasse, *J. Electrochem. Soc.* **1993**, *140*, 216.
- [13] a) A. R. Kontan, R. Hull, R. L. Opila, M. G. Bawendi, M. L. Steigerwald, P. J. Carroll, L. E. Brus, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1327; b) C. F. Hoener, K. A. Allan, A. J. Bard, A. Campion, M. A. Fox, T. E. Mallouk, S. E. Webber, J. M. White, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 3812; c) M. Danek, K. F. Jensen, C. B. Murray, M. G. Bawendi, *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 173; d) M. A. Hines, P. Guyot-Sionnest, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 468; e) O. I. Micic, J. R. Sprague, Z. Lu, A. J. Nozik, *Appl. Phys. Lett.* **1996**, *68*, 3150; f) X. Peng, M. C. Schlamp, A. V. Kadavanich, A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7019; g) B. O. Daboussi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mat-toussi, R. Ober, K. F. Jensen, M. G. Bawendi, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 9463.
- [14] S. T. Frey, W. DeW. Horrocks, Jr., *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 1073.

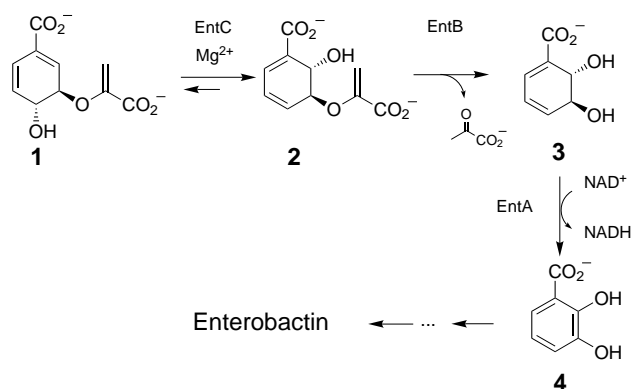
[\*] Dr. M. Müller, Dipl.-Chem. D. Franke  
Institut für Biotechnologie 2 (IBT-2)  
Forschungszentrum Jülich GmbH  
52425 Jülich (Deutschland)  
Fax: (+49)2461-61-3870  
E-mail: mi.mueller@fz-juelich.de

Priv.-Doz. Dr. G. A. Sprenger  
Institut für Biotechnologie 1 (IBT-1)  
Forschungszentrum Jülich GmbH  
52425 Jülich (Deutschland)

[\*\*] D.F. wurde von der Graduiertenförderung des Landes NRW und von der Studienstiftung des deutschen Volkes unterstützt. Professor Dr. Klaus Hantke, Universität Tübingen, danken wir für die freundliche Bereitstellung der *E. coli*-Mutanten H1882 und AN193, Professor Dr. Eckhard Leistner, Universität Bonn, sowie Dr. Rolf Müller, GBF Braunschweig, für hilfreiche Diskussionen und Ursula Degner sowie Regine Halbach für die wertvolle Mithilfe bei den gentechnischen Arbeiten. Professor Dr. Christian Wandrey danken wir für die stets gewährte großzügige Unterstützung.

durch Fermentation rekombinanter *Escherichia-coli*-Stämme in Konzentrationen bis 27 bzw. 13 gL<sup>-1</sup> produzieren.<sup>[9]</sup> Eine Exkretion zweier *trans*-CHDs (Dihydroxydihydrobenzoesäure-Isomere) in Konzentrationen bis 200 mgL<sup>-1</sup> gelang Leister und Mitarbeitern mit (allerdings potentiell humanpathogenen) *Klebsiella-pneumoniae*-Stämmen.<sup>[10]</sup> Es liegt daher nahe, dass *trans*-CHDs einfach und effizient durch einen biotechnologischen Prozess hergestellt werden könnten, welcher auf den Shikimatbiosyntheseweg zurückgreift. Im Folgenden wird der erste direkte Zugang zu (2*S*,3*S*)-Dihydroxy-2,3-dihydrobenzoesäure **3** aus Glucose und anderen erneuerbaren Kohlenstoffquellen mittels im Stofffluss deregulierter, rekombinanter *E. coli*-Stämme beschrieben.

**3** ist ein Intermediat auf dem Biosyntheseweg des Eisenchelators Enterobactin und wird aus Chorismat **1** in zwei Katalyseschritten über Isochorismat **2** gebildet (Schema 1).<sup>[11]</sup>



Schema 1. Metabolite des Enterobactin-Biosyntheseweges sind Chorismat **1**, Isochorismat **2**, (2*S*,3*S*)-Dihydroxy-2,3-dihydrobenzoesäure **3** und 2,3-Dihydroxybenzoat **4**. Die beteiligten Enzyme sind Isochorismatsynthase (EntC), Isochorismatase (EntB) und 2,3-Dihydroxybenzoatsynthase (EntA).

Hieran beteiligte Enzyme sind Isochorismatsynthase (kodiert durch das Gen *entC*) und Isochorismatase (kodiert durch *entB*). Die Aromatisierung zu 2,3-Dihydroxybenzoesäure **4** wird durch 2,3-Dihydroxybenzoatsynthase (kodiert durch *entA*) katalysiert (Schema 1). Eine intrazelluläre Überproduktion von **3** kann demzufolge insbesondere durch zwei Faktoren begünstigt werden: 1. durch Verstärkung des metabolischen Flusses hin zum Zielprodukt, z. B. durch Amplifikation der EntB/EntC-Aktivitäten,<sup>[10]</sup> und 2. durch Verhinderung des Abbaus des Zielmoleküls, d. h. durch Erniedrigung der EntA-Aktivität.

Um zu zeigen, dass **3** durch diese Stoffflussderegulation überproduziert und ins Kulturmedium exkretiert wird, haben wir *E. coli*-Mutanten mit *entA*-Defekt (AN193, H1882) mit Plasmiden transformiert, welche *entB*, *entC* bzw. *entB/entC*

enthielten. Analog dazu haben wir Stämme ohne *entA*-Defekt (DH5*α*, W3110) transformiert (Tabelle 1).

Über Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) konnte eine verstärkte Expression der jeweiligen Gene durch Nachweis der gebildeten Proteine im Zellaufschluss aus allen rekombinanten Stämmen verifiziert werden. Entsprechend erhöhte Enzymaktivitäten konnten durch HPLC-chromatographische Verfolgung des Abbaus von Chorismat **1** zu **2** und **3** eindeutig bestätigt werden.

Bei Fermentation der konstruierten Stämme im Schüttelkolben zeigte sich, dass die *entA*<sup>-</sup>-Mutanten H1882 und AN193 mit plasmidkodierten Funktionen *entB* und *entC* **3** bis zu einer Exkretionsleistung von 27 mg h<sup>-1</sup> pro g Biotrockenmasse produzierten. Die Stämme DH5*α* und W3110 (mit EntA-Aktivität und EntB/EntC-Überproduktion) lieferten ebenfalls **3**, allerdings war die Exkretionsleistung hier mit ca. 9 mg h<sup>-1</sup> pro g Biotrockenmasse deutlich niedriger (Tabelle 2). Bei allen Stämmen, die entweder nur EntB oder nur EntC überproduzierten, sowie bei nichttransformierten Stämmen konnte im Fermentationsmedium weder **3** noch ein anderes Enterobactin-Intermediat (**1**, **2** oder **4**) nachgewiesen werden.

Tabelle 2. Exkretionsleistungen (**3**) [mg h<sup>-1</sup> pro g Biotrockenmasse] bei Überexpression der EntB und EntC kodierenden Gene. Eine Exkretion von **1**, **2** oder **4** wurde nicht beobachtet. Nachweisgrenze ≤ 1 mg L<sup>-1</sup>.

verwendeter Stamm (chromosomales Merkmal)	/pJFentB EntB	/pJFentC EntC	/pJFentBC EntB/EntC
DH5 <i>α</i> , W3110 ( <i>entA</i> <sup>+</sup> )	n.q. <sup>[a]</sup>	n.q. <sup>[a]</sup>	9
AN193, H1882 ( <i>entA</i> <sup>-</sup> )	n.q. <sup>[a]</sup>	n.q. <sup>[a]</sup>	27

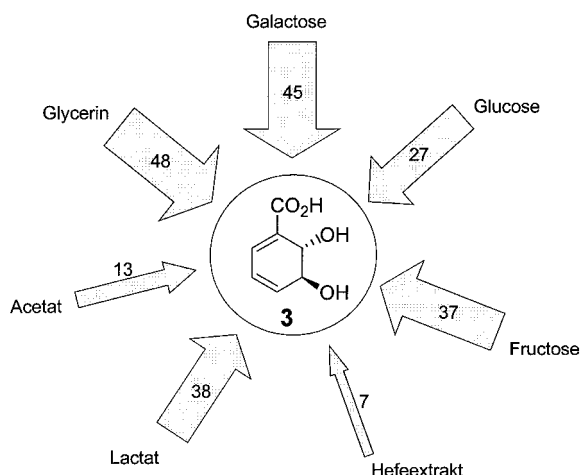
[a] n.q. = nicht quantifizierbar (unterhalb der Nachweisgrenze).

Um inhibierende oder repressorische Einflüsse komplexer Bestandteile des Mediums auf die Produktbildung zu vermeiden, wurde ein nichtkomplexes Minimalmedium bestehend aus Mineralsalzlösung, Puffer und definierter Kohlenstoffquelle entwickelt. Beste Wachstums- und Produktionsgeschwindigkeiten konnten mit einem beschriebenen Minimalsalzmedium<sup>[16]</sup> mit erhöhter Ammoniumchlorid-Konzentration und zusätzlichem 2,3-Dihydroxybenzoat (wegen des *entA*-Defektes) erreicht werden. Die Substanzen, für die einige Stämme auxotroph waren (Thiamin, Leucin, Prolin, Tryptophan), wurden bei allen Experimenten zugesetzt.

**3** kann außer aus Glucose auch aus anderen Kohlenstoffquellen wie Galactose, Fructose, Glycerin, Acetat oder Lactat einfach hergestellt werden (Schema 2). Mit den besten Kohlenstoffquellen (Glycerin, Galactose) werden teilweise sogar noch bessere Exkretionsleistungen (bis 48 mg h<sup>-1</sup> pro g Biotrockenmasse) erreicht.

Tabelle 1. *E. coli*-Ausgangsstämme.

Stamm	relevanter Genotyp	<i>entA</i>	Lit.
DH5 <i>α</i>	F <sup>-</sup> <i>endA1 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>) recA1 supE44 thi-1 Δ(lacZYA-argF)U169 Φ80lacZΔM15</i>	+	[12]
W3110	F <sup>-</sup> λIN( <i>rrnD-rrnE</i> ) prototroph	+	[13]
AN193	<i>trpE38 leuB6 proC14 lacY1 fhuA23 rpsL109(Str<sup>R</sup>) λ<sup>-</sup> entA403</i>	-	[14]
H1882	<i>araD139 Δ(argF-lac)169 λ<sup>-</sup> flhD5301 rpsL150(Str<sup>R</sup>) Δ(fepA-ent)</i>	-	[15]



Schema 2. Die mikrobielle Produktion von **3** ist ausgehend von verschiedenen nachwachsenden Kohlenstoffquellen möglich. Angegeben sind die mit Zellen vom *E. coli*-Stamm AN193 mit den Genen *entB/entC* im Mineralsalzmedium mit 10 g L<sup>-1</sup> Substrat erhaltenen Produktionsleistungen [mg h<sup>-1</sup> pro g Biotrockenmasse].

Die *entA*<sup>-</sup>-Stämme wiesen bezüglich der Produktion von **3** eine hohe Langzeitstabilität bei gleichzeitig hohen Exkretionsleistungen auf – eine wichtige Voraussetzung für hohe Raum-Zeit-Ausbeuten bei kontinuierlicher Prozessführung. In einem pH-geregelten Rührkesselreaktor konnte unter optimierten Bedingungen bei pH 6.8 und 37 °C und unter Glucose-Zudosierung (fed-batch) die Katalysereaktion über einen Zeitraum von über 40 h aufrechterhalten werden. In diesem Zeitraum wurden in einem 20-L-Kultivierungsansatz bei einer Zellkonzentration von 12 g L<sup>-1</sup> Biotrockenmasse aus 690 g Glucose-Monohydrat 92 g **3** erhalten, entsprechend einer molaren Ausbeute von 17%.<sup>[17]</sup> Das Produkt war auch hier wiederum frei von Verunreinigungen durch **1**, **2** oder **4**, sodass eine Trennung durch komplizierte Aufreinigungsverfahren obsolet wird.

Eine einfache und quantitative Abtrennung von den Fermentationssalzen wird durch mehrfache Extraktion des auf pH 3 angesäuerten Permeates der Zellsuspension mit kurzkettigen Alkoholen erreicht (z. B. mit 1-Butanol, Extraktionskoeffizient 30%). Nach säulenchromatographischer Reinigung wird **3** als gelblicher Feststoff hochrein erhalten. Die Ausbeute beträgt 73% bezogen auf die Isolierung. Alternativ hierzu kann durch Ionenaustauschchromatographie das Produkt mit ähnlicher Reinheit in 75% Ausbeute isoliert werden.<sup>[18]</sup> **3** ist bei Raumtemperatur im pH-Bereich 3 ≤ pH ≤ 11 über Wochen stabil.

Zur Demonstration, dass ausgehend von substituierten *trans*-CHDs eine ähnlich vielfältige Folgechemie wie die der *cis*-CHDs aufgebaut werden kann, haben wir exemplarisch ausgehend von **3** regio- und stereoselektive Synthesen zu pharmakologisch interessanten Zielmolekülen erarbeitet.<sup>[19]</sup>

Wir haben gezeigt, dass (2*S*,3*S*)-Dihydroxy-2,3-dihydrobenzoesäure **3** direkt aus Glucose und anderen erneuerbaren Kohlenstoffquellen mittels im Stofffluss deregulierter, rekombinanter *E. coli*-Stämme hergestellt werden kann. Mit diesen Stämmen, welche nicht pathogen sind und nach deutschem Gentechnikgesetz als S1 klassifiziert sind, ist zudem erstmals eine kostengünstige Produktion im Multigramm-Maßstab

möglich. Von besonderem Vorteil ist, dass das Produkt frei von metabolischen Verunreinigungen ist, sodass es einfach isoliert werden kann. Derzeit versuchen wir, auch einen enantioselektiven Zugang zu 3,4-*trans*-CHD-Derivaten durch die Stoffflussderegulierung in rekombinanten Mikroorganismen zu eröffnen.

### Experimentelles

Die Gene *entB* und *entC* wurden aus chromosomaler DNA des *E. coli*-K-12-Wildstamms W3110 in vitro durch Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und je einzeln sowie gemeinsam (in tandem) in das Klonierplasmid pJF119EH1<sup>[20]</sup> inseriert. Die benutzten Oligonucleotide sind 5'-TATGGATCCACGCGCATCAGCCTGAA-3' sowie 5'-GGGCTGCAGACATTTTACCGCTG-3' für *entB* und 5'-GGCGAGTCATATTAAAGCCTTT-3' sowie 5'-TGCGGATCCTCGCTCCTTAATGC-3' für *entC*. Klonierstellen waren *Bam*HI und *Pst*I für *entB* bzw. *Sac*I und *Bam*HI für *entC*. Die *E. coli*-Stämme W3110, DH5α, AN193 und H1882 wurden jeweils mit den so erhaltenen drei Plasmiden transformiert.

Die Fermentationen zu Produktionsuntersuchungen wurden in 100 mL Mineralsalzmedium<sup>[10]</sup> (pH 7 mit 1N NaOH) in 1-L-Schüttelkolben durchgeführt. Dazu wurden Zellen von 100 mL Vorkultur aus Luria-Bertani-Medium<sup>[21]</sup> (mit 100 mg L<sup>-1</sup> Ampicillin, 100 μM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) bei einer optischen Dichte (λ = 600 nm) von 2) in der Phase mittelexponentiellen Wachstums geerntet, in sterilem Mineralsalzmedium (mit 100 mg L<sup>-1</sup> Ampicillin, 100 μM IPTG) resuspendiert und bei 37 °C und 150 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Die Exkretion wurde über einen Zeitraum von 10 h HPLC-chromatographisch verfolgt (maximale Exkretion nach ca. 4 h).

Das Mineralsalzmedium für optimierte Produktion und Wachstum (verändert nach Pan et al.<sup>[6]</sup>) enthält pro Liter 13 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 5 g NH<sub>4</sub>Cl, 40 mg FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 40 mg CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 10 mg MnSO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 2 mg ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 10 mg AlCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 4 mg CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 2 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1 mg CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.5 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 200 mg Leucin, 200 mg Prolin, 200 mg Adenin, 20 mg Thiamin, 200 mg Tryptophan, 20 mg 2,3-Dihydroxybenzoesäure und 100 mg Ampicillin.

Die Kultivierung im 30-L-Rührkessel-Bioreaktor (Chemap, Schweiz, Arbeitsvolumen 20 L) wurde bei pH 6.8 (geregelt) und 37 °C mit dem optimierten Medium durchgeführt. Inokuliert wurde mit 1 L Vorkultur aus Komplexmedium. Die Glucosekonzentration betrug zu Beginn 30 g L<sup>-1</sup>. Die Kohlenstoffquelle wurde dann portionsweise steril zugegeben, sodass eine Konzentration von 5–10 g L<sup>-1</sup> aufrechterhalten wurde. Die Induktion erfolgte bei einer Zellkonzentration von 5 g L<sup>-1</sup> Biotrockenmasse mit 100 μM IPTG. Begast wurde mit 25 L Luft pro Minute.

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel-60 mit Essigsäureethylester/MeOH (5/1) gereinigt. Physikalische Daten von **3** (gelber Feststoff): [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = 3.8 (c = 0.6 in Ethanol); <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, [D<sub>4</sub>]MeOH, 23 °C): δ = 4.10 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 2.5 Hz, 1H; CHOH), 4.50 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 2.5 Hz, 1H; CHOH), 6.20 (m, 2H; C=CH), 7.06 (dd, <sup>3</sup>J(H,H) = 3.3, <sup>4</sup>J(H,H) = 3.2 Hz, 1H; C=CH); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, [D<sub>4</sub>]MeOH, 23 °C): δ = 68.8 (CH), 70.4 (CH), 125.1 (CH), 130.8 (C<sub>quart</sub>), 134.3 (CH), 134.4 (CH), 170.2 (COOH); IR (KBr): ν̄ = 1699 cm<sup>-1</sup> (C=O), 1644 (C=C), 1586 (C=C), 1258, 1075, 1008; UV/Vis (H<sub>2</sub>O): λ<sub>max</sub> (ε) = 279 nm (4900); EIMS (70 eV): m/z (%): 156 (6) [M<sup>+</sup>], 138 (100) [M<sup>+</sup> - H<sub>2</sub>O], 110 (63) [M<sup>+</sup> - 2H<sub>2</sub>O], 93 (10), 82 (29), 65 (13) [C<sub>3</sub>H<sub>5</sub><sup>+</sup>]; HR-MS: ber. für C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>: 156.0423; gef.: 156.0424.

Eingegangen am 31. August 2000 [Z15735]

- [1] Übersichten: a) S. M. Brown, T. Hudlicky in *Organic Synthesis: Theory and Applications*, Vol. 2 (Hrsg.: T. Hudlicky), JAI, New York, **1993**, S. 113–176; b) T. Hudlicky, J. W. Reed in *Advances in Asymmetric Synthesis*, Vol. 1 (Hrsg.: A. Hassner), JAI, New York, **1995**, S. 271–312; c) T. Hudlicky, D. Gonzalez, D. T. Gibson, *Aldrichimica Acta* **1999**, 32, 35–62, zit. Lit.  
 [2] H. A. J. Carless, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 234–235.  
 [3] T. Hudlicky, G. Seoane, T. Pettus, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 4239–4243.

- [4] G. Butora, T. Hudlicky, S. P. Fearnley, M. R. Stabile, A. G. Gum, D. Gonzalez, *Synthesis* **1998**, 665–681.
- [5] a) T. K. M. Shing, E. K. W. Tam, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 353–356; b) B. M. Trost, L. S. Chupak, T. Lübbers, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1732–1740.
- [6] In Anlehnung an eine Syntheseroute von Trost et al.<sup>[5b]</sup> haben wir **3** in racemischer Form ausgehend von Methylpropiolat und Crotonaldehyd in sechs Reaktionsschritten in 14% Gesamtausbeute synthetisiert.<sup>[19]</sup>
- [7] a) D. R. Boyd, N. D. Sharma, H. Dalton, D. A. Clarke, *Chem. Commun.* **1996**, 45–46; b) B. P. McKibben, G. S. Barnosky, T. Hudlicky, *Synlett* **1995**, 806–807; c) D. R. Boyd, N. D. Sharma, C. R. O'Dowd, F. Hempenstall, *Chem. Commun.* **2000**, 2151–2152.
- [8] T. K. M. Shing, E. K. W. Tam, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1547–1554.
- [9] K. M. Draths, D. R. Knop, J. W. Frost, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1603–1604.
- [10] R. Müller, M. Breuer, A. Wagener, K. Schmidt, E. Leistner, *Microbiology* **1996**, *142*, 1005–1012.
- [11] C. F. Earhart in *Escherichia coli and Salmonella*, Vol. 1 (Hrsg.: F. C. Neidhardt), 2. Aufl., ASM, Washington, DC, **1996**, S. 1075–1090.
- [12] D. Hanahan, *J. Mol. Biol.* **1983**, *166*, 557–580.
- [13] a) C. W. Hill, B. W. Harnish, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 7069–7072; b) K. F. Jensen, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 3401–3407.
- [14] a) G. B. Cox, F. Gibson, R. K. J. Luke, N. A. Newton, I. G. O'Brien, H. Rosenberg, *J. Bacteriol.* **1970**, *104*, 219–226; b) B. A. Ozenberger, T. J. Brickman, M. A. McIntosh, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 775–783.
- [15] a) M. J. Casadaban, *J. Mol. Biol.* **1976**, *104*, 541–555; b) M. J. Casadaban, S. N. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 4530–4533; c) Y. Kameda, T. Iino, *J. Bacteriol.* **1979**, *139*, 721–729.
- [16] J. G. Pan, J. S. Rhee, J. M. Lebeault, *Biotechnol. Lett.* **1987**, *9*, 89–94.
- [17] Bezogen auf die maximal erreichbare theoretische Ausbeute entspricht dies einer relativen molaren Ausbeute von 40%; K. Li, J. W. Frost, *Biotechnol. Prog.* **1999**, *15*, 876–883.
- [18] M. Halfar, J. Thömmes, D. Franke, M. Müller, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [19] V. Lorbach, D. Franke, M. Müller, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [20] J. P. Fürste, W. Pansegrau, R. Frank, H. Blöcker, P. Scholz, M. Bagdasarian, E. Lanka, *Gene* **1986**, *48*, 119–131.
- [21] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor, NY, **1989**.

## Wasserunterstützter intramolekularer Elektronentransfer vom Ring zur Seitenkette in $N,N,N',N'$ -Tetraalkyl-*p*-phenylendiamin-Radikalen – Umkehrung der Seitenketten-Deprotonierung von Radikalkationen

Steen Steenken\* und Abel J. S. C. Vieira

Bei Arenen mit (substituierten) Alkylgruppen als Substituenten ist oft eine „Aktivierung“ der Seitenkette möglich, indem der „Oxidationszustand“ des Arens, z. B. durch Ein-Elektron-Reduktion<sup>[1–7]</sup> oder, was häufiger durchgeführt wurde, -Oxidation<sup>[8–13]</sup> verändert wird. Eine charakteristische

[\*] Prof. S. Steenken, Prof. A. J. S. C. Vieira<sup>[†]</sup>  
Max-Planck-Institut für Strahlenchemie  
45413 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)  
Fax: (+49) 208-306-3951  
E-mail: steenken@mpi-muelheim.mpg.de

[†] Gegenwärtige Anschrift:  
Departamento de Química, Instituto Superior Tecnico  
1096 Lisboa (Portugal)

Reaktion von Radikalkationen ist die C-H-Deprotonierung in der Seitenkette (typischerweise in der Benzylposition), die zu neutralen (Benzyl-)Radikalen führt. Die umgekehrte Reaktion, die Protonierung an C, ist auch bekannt (für Radikalanionen),<sup>[14–20]</sup> betrifft aber *nicht* die Seitenkette, sondern den Ring. Wir haben nun ein Beispiel gefunden für die Protonierung eines Seitenketten-C-Atoms (eine Reaktion, die ein neutrales Radikal betrifft), wobei die erforderliche hohe Elektronendichte an der Seitenkette durch einen Elektronentransfer vom Ring zur Seitenkette zur Verfügung gestellt wird.

$N_2O$ -gesättigte wässrige Lösungen (pH 7–12) von  $N,N,N',N'$ -Tetraethyl-*p*-phenylendiamin (TMPD; eingesetzt als Dihydrochlorid) wurden den 100-ns-Elektronenpulsen eines 3-MeV-van-de-Graaff-Beschleunigers ausgesetzt und die zeitabhängigen Änderungen der Transmission oder der Leitfähigkeit der Lösung aufgezeichnet. Die Bestrahlung von Wasser führt zu den Radikalen  $\cdot OH$  (45%),  $H\cdot$  (10%) und  $e_{aq}^-$  (45%). Das hydratisierte Elektron reagiert mit  $N_2O$  (20 mM) in  $\leq 20$  ns unter Bildung eines weiteren  $\cdot OH$ -Radikals. In einer 0.2–0.5 mM TMPD-Lösung tritt unter diesen Bedingungen das Radikalkation  $TMPD^{+\cdot}$  auf, dessen  $\lambda_{max}$ -Werte<sup>[21]</sup> bei 330, 565 und 610 nm liegen (Abbildung 1).<sup>[22]</sup>  $TMPD^{+\cdot}$  entsteht hierbei auf zwei Wegen, einem direkten und einem indirekten. Die direkte, „schnelle“ Reaktion liefert  $(55 \pm 5)\%$  der Gesamtausbeute an  $TMPD^{+\cdot}$  (Abbildung 1, Einschub b). Die Geschwindigkeit, aber nicht die Ausbeute dieser

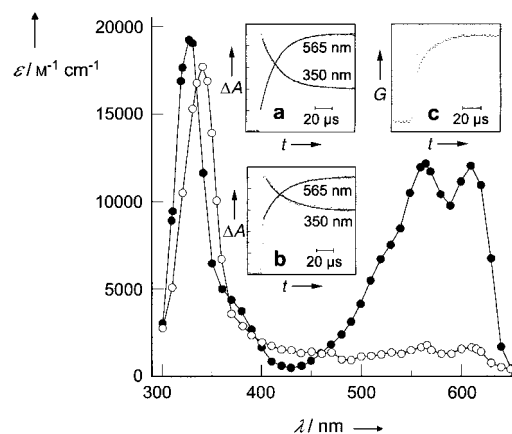


Abbildung 1. Absorptionsspektren nach der Reaktion von  $O^{\cdot-}$  mit 0.4 mM TMPD in  $N_2O$ -gesättigtem Wasser ( $[KOH] = 0.4$  M,  $20^\circ C$ ; ● = Spektrum von  $TMPD^{+\cdot}$ ; ○ = Spektrum von  $>NCH_2\cdot$ ). Einschub a und b zeigen die Abnahme der Menge an  $>NCH_2\cdot$  (350 nm) und die damit einhergehende Bildung von  $TMPD^{+\cdot}$  (565 nm) bei 0.4 M KOH pH 7.4. Einschub c zeigt den Anstieg der Leitfähigkeit  $G$  bei pH 10, der im Wesentlichen die Bildung von  $OH^-$  widerspiegelt.

Reaktion hängt von der TMPD-Konzentration ab,<sup>[23]</sup> wohingegen die Geschwindigkeit der zweiten, langsameren Reaktion ( $k = (6.6 \pm 1) \times 10^4$  s<sup>-1</sup> bei  $20^\circ C$ <sup>[24]</sup>) nicht von der TMPD-Konzentration (0.1–1 mM) und vom pH-Wert (7–12) abhängt, wohl aber von der Temperatur (zwischen 0 und  $50^\circ C$ ). Aus dieser Temperaturabhängigkeit ergeben sich die Eyring-Parameter für die zugrunde liegende Reaktionsfolge aus Elektronentransfer und Seitenkettenprotonierung (siehe Schema 2) zu  $\Delta H^\ddagger = (4.9 \pm 0.5)$  kcal mol<sup>-1</sup> und  $\Delta S^\ddagger =$