

252. Eine einfache enzymatische Methode zur Herstellung von D- und L-Tryptophan

von M. Brenner, E. Sailer und V. Kocher.

(18. IX. 48.)

Im Zusammenhang mit unseren Arbeiten über die Einwirkung von Pankreasfermenten auf den DL-Methioninisopropylester¹⁾ interessierte uns auch das entsprechende Verhalten des leicht zugänglichen und relativ beständigen DL-Tryptophanmethylesters. Es zeigte sich, dass krystallisiertes Chymotrypsin die L-Komponente dieses Esters in Gegenwart von wenig Wasser rasch und praktisch vollständig verseift. Das Reaktionsprodukt ist ein leicht trennbares Gemisch von optisch ziemlich reinem L-Tryptophan und unverändertem D-Tryptophanmethylester. Die Bildung von schwerlöslichen peptidartigen Kondensationsprodukten¹⁾ konnte hier nicht beobachtet werden. Krystallisiertes Trypsin wirkt in gleicher Weise, aber sehr viel langsamer, als das Chymotrypsin.

Es war naheliegend, die aufgefundenene Fermentreaktion zur präparativen Gewinnung von D- und L-Tryptophan heranzuziehen. Voraussetzung war jedoch, dass sich das teure Chymotrypsin durch ein billigeres Präparat ersetzen liess, und dass ein zuverlässiges Reinigungsverfahren für die roh anfallenden, optisch nicht unbedingt reinen Antipoden des Tryptophans gefunden wurde.

Das krystallisierte Chymotrypsin konnte durch das schon früher¹⁾ von uns gebrauchte Pankreasenzym der Firma *NOVO Therapeutisk Laboratorium A/S*, Kopenhagen, ersetzt werden. Dieses Handelsprodukt enthält offenbar relativ große Mengen Chymotrypsin. Für den Laboratoriumsgebrauch ist es etwas unrein. Seine dialysierte Lösung aber liefert bei lyophilem Trocknen ein monatelang haltbares Präparat, das den Anforderungen hinsichtlich Reinheit, Aktivität und Preis genügt. Dieses Produkt wird im folgenden kurz als „Ferment“ bezeichnet.

Die besten Aussichten für eine wirksame Reinigung des anfallenden Roh-Tryptophans bot der Weg über das Salz einer aromatischen Sulfonsäure²⁾. Die leicht zugängliche Naphtalin- β -sulfosäure bildet mit optisch aktivem und mit racemischem Tryptophan gut krystallisierende Nasylate³⁾ der Zusammensetzung $C_{11}H_{12}O_2N_2$,

¹⁾ M. Brenner und V. Kocher, Exper. **4**, 73 (1948).

²⁾ M. Bergmann et al., J. Biol. Chem. **129**, 609 (1939); **135**, 487 (1940); **143**, 121 (1942); K. Vogler und F. Hunziker, Helv. **30**, 2013 (1947); K. Vogler und H. Koenig, Helv. **31**, 183 (1948).

³⁾ Zur Bezeichnung vgl. M. Bergmann und W. H. Stein, J. Biol. Chem. **129**, 609 (1939).

$C_{10}H_7SO_3H$, H_2O ¹⁾). Der korrigierte Schmelzpunkt (Kofler-Block) der optisch aktiven Salze liegt bei 263—264° (Zersetzung), derjenige des racemischen Salzes bei 250—252° (Zersetzung). Die Löslichkeit des L-Salzes in Wasser wurde bei 20° zu etwas 0,7%, bei 3° zu etwa 0,5% bestimmt. Für das racemische Salz ergaben sich praktisch dieselben Werte. Unter solchen Umständen durfte man bei der Krystallisation der Nasylate von stark angereichertem D- und L-Tryptophan ohne Schwierigkeit eine völlige „optische“ Reinigung erwarten. Die Erwartung wurde im Modellversuch bestätigt. Ein Gemisch aus 9 Teilen L- und 1 Teil DL-Salz lieferte bei zweimaligem Umkrystallisieren 5 Teile optisch reines L-Salz. Der Versuch zeigte gleichzeitig, dass der Anfangsgehalt an racemischem Tryptophan im Hinblick auf die Ausbeute bei der Reinigung nicht grösser als 10% sein sollte. Diese Bedingung wird durch die Produkte der Fermentreaktion erfüllt. Die Zerlegung der gereinigten Nasylate erfolgt praktisch ohne Verluste mit Hilfe von Diäthylamin in Alkohol.

Auf der Basis der obigen Resultate ergab sich das folgende Vorgehen für die präparative Herstellung von D- und L-Tryptophan: öliges DL-Tryptophanmethylester wird bei 37° mit 5 Gew.-% Wasser und 2 Gew.-% „Ferment“ kurze Zeit verrührt. Es entsteht eine homogene Lösung. Man lässt nun den Ansatz 36 Stunden bei 37—38° stehen. Nach dieser Zeit wird das vollständig erstarrte Reaktionsgemisch in Äther aufgeschlämmt und durch Filtration in einen ätherlöslichen und einen ätherunlöslichen Anteil getrennt. Der unlösliche Anteil besteht aus rohem L-Tryptophan und Fermenteiweiss, der lösliche Anteil aus stark angereichertem D-Tryptophanmethylester. Eine zweite Fermentbehandlung dieses Esters liefert im Endergebnis fast theoretische Ausbeuten an rohem L-Tryptophan und D-Tryptophanmethylester. Letzterer wird mit methanolischem Bariumhydroxyd zum rohen D-Tryptophan verseift. Die Rohprodukte enthalten, bezogen auf Gesamttryptophan, je etwa 95% vom einen und 5% vom anderen Antipoden.

Diese Rohprodukte dürften für manche Zwecke direkt verwendbar sein. Die reinen Antipoden erhält man über ihre Nasylate. Die Ausbeuten an reinem D- und L-Tryptophan betragen, bezogen auf eingesetztes DL-Tryptophan, 40—60%.

Kürzlich ist von amerikanischer Seite auf eine unerwartete Esterasewirkung von Trypsin und Chymotrypsin gegenüber einigen spezifischen, acylierten Aminosäure- und Peptidestern aufmerksam gemacht worden²⁾. Die von den zitierten Autoren untersuchten freien Aminosäureester (Glykokoll-, Phenylalanin- und Tyrosin-äthylester) wurden unter den gewählten Versuchsbedingungen durch Trypsin nicht oder nur sehr langsam gespalten. Entsprechende Versuche mit Chymotrypsin werden nicht erwähnt. Eigene, un-

¹⁾ Die Salzkristalle können unter gewissen Bedingungen einen höheren Gehalt an Sulfosäure aufweisen. Vgl. dazu den exp. Teil.

²⁾ G. W. Schwert, H. Neurath, S. Kaufmann und J. E. Snoke, J. Biol. Chem. **172**, 221 (1948). S. Kaufmann, G. W. Schwert und H. Neurath, Arch. Biochem. **17**, 203 (1948).

veröffentlichte Versuche haben ergeben, dass krystallisiertes Chymotrypsin (*Armour*) bei unserer Versuchsanordnung¹⁾ racemischen Phenylalaninisopropylester wie den oben erwähnten Tryptophanester, aber langsamer, asymmetrisch verseift. In der gleichen Weise, jedoch sehr viel schwächer, wirkt krystallisiertes Trypsin (*Armour*). DL-Valinisopropylester wird andererseits weder von Chymotrypsin, noch von Trypsin in nennenswerter Weise angegriffen. Wir sind uns bewusst, dass diese unter extremen Bedingungen gemachten qualitativen Beobachtungen mit Vorsicht zu interpretieren sind. Es scheint aber, dass der Spezifitätsbereich der Esterasewirkung von Chymotrypsin sich auch auf gewisse freie Aminosäureester erstreckt.

Wir danken der *J. R. Geigy AG.* in Basel für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil.

Die Schmelzpunkte wurden auf dem *Kofler*-Block bestimmt und sind korrigiert. Fehlergrenze $\pm 2^\circ$.

I. DL-Tryptophanmethylester.

Racemisches Tryptophan wurde nach der Vorschrift von *M. Kempe* und *E. Abderhalden*²⁾ mit methanolischer Salzsäure verestert. Das gut krystallisierende Esterhydrochlorid schmilzt bei 216° . Ausbeute 96%.

25 g DL-Tryptophanmethylester-Hydrochlorid wurden mit 400 cm³ Äther überschichtet, in einer Kältemischung auf -5° abgekühlt, mit 27 g Kaliumcarbonat (2 Mol.) in 30-proz. wässriger Lösung versetzt und kräftig geschüttelt. Die wässrige Schicht wurde noch 4mal mit je 50 cm³ frischem Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten, mit 25 cm³ Wasser gewaschenen Ätherauszüge trocknete man einige Stunden über Pottasche. Nach dem Abdestillieren des Äthers (Badtemperatur unter 40°) blieb der Ester als ein hochviscoses, hellbraunes Öl zurück. Ausbeute 20 g (93% der Theorie).

Der Ester kann krystallin erhalten werden, wenn man ihn mit Petroläther verrührt und stehen lässt. Reinigung durch Umkrystallisieren aus Äther-Petroläther. Smp. $71-73^\circ$. Zur Analyse wurde 3 Stunden am Hochvakuum bei Zimmertemperatur getrocknet.

3,970 mg Subst. gaben 2,340 mg H₂O und 9,587 mg CO₂

C₁₂H₁₄O₂N₂ Ber. C 65,96 H 6,46%

Gef. „ 65,90 „ 6,60%

II. Beispiele zur enzymatischen „asymmetrischen“ Verseifung.

1. Krystallisiertes Chymotrypsin. 700 mg DL-Tryptophanmethylester, 7 mg krystallisiertes Chymotrypsin „*Armour*“ (rund 50% Ammoniumsulfat enthaltend) und 35 mg Wasser wurden nach guter Durchmischung bei $37-38^\circ$ aufbewahrt. Die Reaktionsmasse durchsetzte sich in kurzer Zeit mit krystallisierendem L-Tryptophan und war bereits nach 1 Stunde erstarrt. Man verrührte sie nach 40 Stunden mit 10 cm³ Äther und erhielt durch Filtration eine Krystallmasse, die noch 3mal mit je 10 cm³ Äther gewaschen wurde. Ausbeute an rohem L-Tryptophan 96%. Einmalige Krystallisation aus 66-proz. Alkohol ergab fast reines L-Tryptophan mit der Drehung $[\alpha]_D^{20} = -30^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,5$ in Wasser).

Frischer, sorgfältig zubereiteter Methylester zeigte im Kontrollversuch (kein Ferment, 5% H₂O, 40 h, $38-39^\circ$) keine Veränderung.

2. Krystallisiertes Trypsin (*Armour*). Ansatz wie bei Chymotrypsin. Die Reaktion trat nur sehr langsam ein. Nach 6 Stunden war noch kein Anzeichen einer Verseifung sichtbar. Nach 30 Stunden wurde aufgearbeitet. Ausbeute 20%. Ein Kontrollversuch ohne Ferment ergab nach derselben Zeit keine ätherunlöslichen Produkte. Das erhaltene Tryptophan wurde in heissem Wasser aufgenommen, durch Filtration vom ausgeflockten Fermenteiweiss abgetrennt und auf die übliche Weise (vgl. unten) in das Nasyat über-

¹⁾ Vgl. den exp. Teil der vorliegenden Arbeit.

²⁾ Z. physiol. Ch. **52**, 214 (1907).

geführt. Das Salz wurde ohne weitere Reinigung zerlegt und lieferte ein Tryptophan mit der Drehung $[\alpha]_D^{20} = -28^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,25$ in Wasser).

3. Amorphes Chymotrypsin. 4mal umkrystallisiertes Chymotrypsinogen wurde nach den Angaben von *Northrop*¹⁾ in amorphes Chymotrypsin übergeführt²⁾. Das Präparat wurde feucht aufbewahrt und gelangte in dieser Form zur Anwendung. Ansatz wie bei Chymotrypsin. Die Reaktion trat sofort ein. Nach 2 Stunden war der Inhalt des Gefässes erstarrt. Aufarbeitung nach 20 Stunden. Ausbeute an rohem L-Tryptophan 95%.

4. Käufliches Pankreasenzym³⁾. 700 mg DL-Tryptophanmethylester, 14 mg Enzym (Aktivität 13–14 NOVO-Einheiten pro g) und 35 mg Wasser wurden bei 37–38° 36 Stunden der Reaktion überlassen. Man extrahierte den unveränderten Ester 4mal mit je 10 cm³ Äther. Zurück blieben 285 mg eines Gemisches von Rohtryptophan und Fermenteiweiss. Die Ausbeute an Rohtryptophan betrug somit 270 mg (84% der Theorie). Das Rohprodukt enthielt 13,2% N (Tryptophan ber. N 13,7%) und mehr als 90% L-Tryptophan (mikrobiologischer Test mit *Streptococcus faecalis*). Drehung $[\alpha]_D^{20} = \text{ca. } -23^\circ$ (Wasser).

III. Untersuchung der Tryptophan-nasylate.

1. Bruttoformeln. 1 mMol DL- bzw. L-Tryptophan und 1,1 mMol Naphtalin- β -sulfosäure wurden in möglichst wenig heissem Wasser gelöst. Die Salze krystallisierten beim Erkalten in Form von Blättchen. Sie wurden zur Analyse 2mal aus Wasser umkrystallisiert.

DL-Salz: Smp. 250–252° unter Zersetzung. Analysenprobe luftgetrocknet bis zur Gewichtskonstanz.

3,542 mg Subst. gaben 7,535 mg CO₂ und 1,722 mg H₂O

C ₁₁ H ₁₂ O ₂ N ₂ , C ₁₀ H ₇ SO ₃ H, H ₂ O	Ber. C 58,58	H 5,15%
(430,46)	Gef. „ 58,05	„ 5,44%

L-Salz: Smp. 263–264° unter Zersetzung. Zur Analyse wurde 6 Stunden im Hochvakuum bei Zimmertemperatur getrocknet.

3,793 mg Subst. gaben 8,129 mg CO₂ und 1,800 mg H₂O

C ₁₁ H ₁₂ O ₂ N ₂ , C ₁₀ H ₇ SO ₃ H, H ₂ O	Ber. C 58,58	H 5,15%
(430,46)	Gef. „ 58,49	„ 5,31%

Das Krystallwasser wird bei höherer Temperatur leicht abgegeben. Eine Probe war nach 4-stündigem Trocknen im Hochvakuum bei 70–80° wasserfrei. Der Schmelzpunkt lag unverändert bei 261–264° (Zersetzung).

3,714 mg Subst. gaben 8,324 mg CO₂ und 1,645 mg H₂O

C ₁₁ H ₁₂ O ₂ N ₂ , C ₁₀ H ₇ SO ₃ H	Ber. C 61,15	H 4,98%
(412,44)	Gef. „ 61,16	„ 4,96%

Durch schwankende Ausbeuten bei der Zerlegung (vgl. unten) des L-Salzes wurden wir auf Unregelmässigkeiten in seiner Zusammensetzung aufmerksam. Wir fanden, dass Salze, welche in Gegenwart von überschüssiger Naphtalin- β -sulfosäure (Überschuss 20–1000%) erhalten wurden, manchmal, speziell bei langsamer Krystallisation, stöchiometrisch überschüssige Sulfosäure enthielten. Die Erscheinung wurde titrimetrisch untersucht. Tabelle 1 zeigt die Resultate. Festzuhalten ist, dass man bei wiederholtem Umkrystallisieren eines rohen Salzes in der Regel zu stöchiometrisch zusammengesetzten Präparaten gelangt:

Salz Nr. 1: rasche Krystallisation aus einer Lösung von 1,2 mMol Sulfosäure und 1 mMol Tryptophan in ca. 15 cm³ Wasser.

¹⁾ Crystalline Enzymes, New York, 1939.

²⁾ Wir danken Herrn *Rudolf Pfister* für die Herstellung dieses Präparates.

³⁾ Produkt von *NOVO Terapeutisk Laboratorium A/S*, Kopenhagen; Vertretung für die Schweiz: *Aldepha AG.*, Zürich. Wir möchten der *Aldepha AG.* auch an dieser Stelle für die freundliche Überlassung eines Musters unseren besten Dank aussprechen.

Salz Nr. 2: langsame Krystallisation aus einer Lösung von 1,2 mMol Sulfosäure und 1 mMol Tryptophan in ca. 15 cm³ Wasser.

Salz Nr. 3: Salz Nr. 2 zweimal aus Wasser umkrystallisiert.

Tabelle 1.

Das getrocknete, krystallwasserfreie Salz wurde in 5–6 cm³ Wasser gelöst und die Lösung mit 0,01-n. alkoholischer (90-proz.) Kalilauge (mit Kaliumbijdodat potentiometrisch eingestellt) unter Verwendung einer Glaselektrode auf p_H 6,4 titriert. Mittel aus je 2 Titrationen.

Salz No.	Einwaage mg	cm ³ KOH 0,01-n.		molares Verhältnis Sulfosäure: Tryptophan	Smp.
		gebraucht	für normales Salz ber.		
1	8,001	1,941	1,941	1:1	261–264°
2	8,200	2,208	1,982	5:4	258–259°
3	8,141	1,972	1,975	1:1	263–264°

2. Löslichkeiten. Proben von etwa 500 mg Salz wurden in je 50 cm³ warmem Wasser gelöst und hierauf während 9 bzw. 14 Stunden unter ständigem Rühren bei 3° bzw. 20° der Krystallisation überlassen. Man filtrierte und titrierte je 20 cm³ der Mutterlauge mit 0,1-n. KOH unter Verwendung von *Tashiro*-Reagens¹⁾ als Indikator. Die ermittelten Löslichkeiten sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Sie sind als Näherungswerte aufzufassen.

Tabelle 2.

Bodenkörper	cm ³ 0,1-n. KOH pro 20 cm ³ gesättigte Lösung		Löslichkeit in g pro 100 cm ³ Wasser	
	3°	20°	3°	20°
DL-Salz	2,30	3,20	0,49	0,69
L-Salz	2,30	3,02	0,49	0,65

3. „Optische“ Reinigung. 2,7 g L-Salz wurden mit 300 mg DL-Salz vermischt (Racemisierungsgrad 10%). Man löste das Gemisch, welches einem Tryptophan mit der Drehung $[\alpha]_D^{21} = -29^\circ$ entsprach, in ungefähr 50 cm³ Wasser auf, impfte mit etwas L-Salz an und liess erkalten. Es krystallisierten 1,95 g Nasylat. Ausbeute 72% bezogen auf eingesetztes L-Salz. Eine Probe davon gab bei der Zerlegung Tryptophan mit der Drehung $[\alpha]_D^{21} = -31^\circ$. Der Rest des Nasylates wurde noch einmal in Wasser gelöst und angeimpft. Es krystallisierte nunmehr optisch reines L-Salz. Ausbeute 72% oder, bezogen auf ursprünglich eingesetztes L-Salz, 54%. Die Drehung des freigesetzten Tryptophans betrug jetzt $[\alpha]_D^{21} = -32,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,5$ in Wasser, $l = 2$ dm). Sie änderte sich nicht mehr, als das Nasylat ein drittes Mal umkrystallisiert wurde. *M. S. Dunn* und *L. B. Rockland*²⁾ geben für analytisch reines L-Tryptophan den Wert $[\alpha]_D^{25} = -32,15^\circ$ ($c = 2,071$ in Wasser, $l = 4$ dm). Zum Vergleich bestimmten wir noch die Drehung des L-Tryptophans von *General Biochemicals, Inc.*, Chagrin Falls, Ohio. Wir fanden $[\alpha]_D^{21} = -32,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,5$ in Wasser, $l = 2$ dm).

¹⁾ 100 cm³ 0,03-proz. alkoholische Methylrotlösung + 15 cm³ 0,1-proz. alkoholische Methylenblaulösung.

²⁾ *Advances in Protein Chemistry* **3**, 354 (1947).

Vergleichsweise wurde schliesslich ein Gemisch von 1,35 g L-Tryptophan und 150 mg DL-Tryptophan ($[\alpha]_D^{21} = -29^\circ$) aus 100 cm³ 50-proz. Alkohol umkrystallisiert. Man erhielt 800 mg Blättchen mit der Drehung $[\alpha]_D^{21} = -29^\circ$. Auch eine zweite Krystallisation aus 50-proz. Alkohol bewirkte keine Änderung der Drehung.

4. Zerlegung. 1 Mol feinpulverisiertes Nasylat wurde in eine 2- bis 3-proz. alkoholische Lösung von 1,1 Mol Diäthylamin eingetragen und die Suspension 2 Stunden bei Zimmertemperatur oder 10 Minuten bei ca. 60° gerührt. Das Amin bildete dabei mit der Sulfosäure ein alkohollösliches Salz. Gleichzeitig fiel das in Alkohol schwer lösliche Tryptophan nahezu quantitativ aus. Es wurde noch einmal in frischem Alkohol suspendiert und war dann praktisch rein.

Versetzt man die alkoholische Mutterlauge von der Zerlegung eines Salzes mit der berechneten Menge Bariumhydroxyd und verdampft hierauf zur Trockne, so ist das Destillat wiederum als alkoholische Diäthylaminlösung verwendbar. Aus dem zurückbleibenden naphthalin- β -sulfosauren Barium lässt sich mit der berechneten Menge Schwefelsäure auch die Sulfosäure wieder regenerieren.

IV. Herstellung von D- und L-Tryptophan.

30 g Pankreasenzym¹⁾ mit einer Aktivität von 13–14 NOVO-Einheiten pro g wurden in 300 cm³ Wasser suspendiert. Man dialysierte die Suspension 15 Stunden gegen fliessendes Wasser und trennte hierauf das Unlösliche durch zentrifugieren ab. Die klare Fermentlösung wurde lyophil getrocknet. Ausbeute 9 g „Ferment“.

20 g frisch bereiteter, ölgiger DL-Tryptophanmethylester wurden mit 1 cm³ Wasser und 400 mg „Ferment“ bei 37° zu einer klaren Lösung verrührt und hierauf bei 37–38° sich selbst überlassen. Das Gemisch begann sich schon nach 1 Stunde zu trüben und war nach 4 Stunden erstarrt. Nach 36-stündiger Reaktion wurde der feste, hellbraune Kuchen mit 50 cm³ Äther verrieben. Man filtrierte und behandelte den ätherunlöslichen Anteil noch 4mal mit je 50 cm³ Äther. Ätherunlösliches 7,9 g. Die Ätherlösungen wurden vereinigt und der Äther vollständig abdestilliert (Badtemperatur unter 40°). Man verrührte das zurückbleibende Öl von neuem mit 5 Gew.-% Wasser und 400 mg „Ferment“, liess 36 Stunden reagieren und behandelte mit Äther. Ätherunlösliches: 2,1 g. Die Ätherlösungen wurden zweimal mit je 50 cm³ Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Es blieben 9,6 g roher D-Ester zurück. Die Ausbeute an rohem L-Tryptophan betrug unter Berücksichtigung des beigemengten Fermenteiwisses 9,2 g.

L-Tryptophan. Das obige ätherunlösliche Reaktionsprodukt wurde in 200 cm³ kochendem Wasser aufgenommen und von ausgeflocktem Fermenteiweiss durch eine dünne Schicht Kohle abfiltriert. Man setzte zur heissen Lösung 12,3 g (1,16 Mol.²⁾) Naphthalin- β -sulfosäure und nach erfolgter Auflösung 250 mg Entfärbungskohle zu, filtrierte siedend heiss durch etwas Kohle und wusch mit wenig Wasser nach. Das Nasylat krystallisierte sofort aus. Es wurde nach 1-stündigem Stehen bei 0° abgesaugt und mit wenig Eiswasser gewaschen. Ausbeute 13,5 g. Aus der Mutterlauge wurden nochmals 1,3 g Nasylat von derselben Reinheit gewonnen. Dies gelang allerdings nicht durch blosses Einengen, sondern erst, als die Mutterlauge mit Diäthylamin schwach alkalisch gemacht, im Vakuum zur Trockne verdampft, der Rückstand mit absolutem Alkohol extrahiert und das zurückbleibende Roh-Tryptophan mit Naphthalin- β -sulfosäure behandelt wurde. Man krystallisierte die vereinigten Nasylate nochmals aus Wasser um und erhielt 10,8 g reines L-Salz. Es wurde zur Zerlegung in einer Lösung von 3,2 cm³ Diäthylamin in 155 cm³ absolutem Alkohol suspendiert. Man erwärmte unter gutem Umrühren auf 60° und kühlte dann auf 0° ab. Die Aminosäure wurde abfiltriert, in frischem Alkohol suspendiert, ab-

¹⁾ Vgl. Fussnote ³⁾, S. 1911.

²⁾ „Molgewicht“ = 235. Die ursprünglich als Trihydrat vorliegende Säure hatte im Exsikkator durchschnittlich 1,5 Mol Wasser verloren.

filtriert und mit Alkohol und Äther gewaschen. Ausbeute 4,8 g optisch reines L-Tryptophan. Eine Probe wurde zur Analyse und Drehung aus 66-proz. Alkohol umkrystallisiert und 2 Stunden im Hochvakuum bei 70° getrocknet.

3,991 mg Subst. gaben 9,465 mg CO₂ und 2,200 mg H₂O
 2,258 mg Subst. gaben 0,281 cm³ N (27°, 741 mm)

C₁₁H₁₂O₂N₂ Ber. C 64,67 H 5,93 N 13,73%
 (204,11) Gef. „ 64,72 „ 6,17 „ 13,81%

$[\alpha]_D^{21} = -32,5^\circ \pm 1^\circ$ (c = 0,5 in Wasser, l = 2 dm).

D-Tryptophan. Die 9,6 g D-Ester wurden zur Verseifung in 0,2-n. methanolischem Bariumhydroxyd (1,5 Mol Ba(OH)₂ pro Mol Ester) gelöst und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Man fügte hierauf die zur Fällung des Bariums berechnete Menge Schwefelsäure hinzu, ersetzte das Methanol nach seiner Entfernung im Vakuum durch ein gleiches Volumen heisses Wasser, kochte auf, liess einige Minuten stehen und filtrierte vom Bariumsulfat ab. Letzteres musste zur Entfernung von adsorbiertem Tryptophan gut mit heissem Wasser ausgewaschen werden. Das Waschwasser wurde mit dem Filtrat vereinigt und im Vakuum zur Trockne verdampft. Ausbeute 8,3 g rohes D-Tryptophan mit der Drehung $[\alpha]_D^{20} = +29,5^\circ \pm 2^\circ$. Die Reinigung wurde wie oben über das Nasylat durchgeführt und gab 5,6 g optisch reines D-Tryptophan. Eine Probe wurde zur Analyse und Drehung aus 66-proz. Alkohol umkrystallisiert und 2 Stunden im Hochvakuum bei 70° getrocknet.

4,085 mg Subst. gaben 9,699 mg CO₂ und 2,139 mg H₂O
 2,780 mg Subst. gaben 0,346 cm³ N (26°, 741 mm)

C₁₁H₁₂O₂N₂ Ber. C 64,67 H 5,93 N 13,73%
 (204,11) Gef. „ 64,79 „ 5,86 „ 13,85%

$[\alpha]_D^{21} = +32,5^\circ \pm 1^\circ$ (c = 0,5 in Wasser, l = 2 dm).

Die Analysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium der Org.-chem. Anstalt der Universität Basel ausgeführt.

Zusammenfassung.

Racemischer Tryptophanmethylester wird von Chymotrypsin „*asymmetrisch*“ verseift. Die Reaktion wird unter Verwendung eines technischen Ferment-Präparates zur präparativen Herstellung von optisch reinem D- und L-Tryptophan benützt.

Universität Basel, Anstalt für organische Chemie.