

# **Die chemischen Determinanten des Wachstums.**

Von

**Casimir Funk und Archibald Bruce Macallum** (Beit Memorial  
Research Fellow).

---

Mit einer Tafel.

---

(From the Department of Chemical Physiology, Cancer Hospital Research Institute,  
Brompton, London, S. W.)

(Der Redaktion zugegangen am 11. Mai 1914.)

---

Am Ende des Jahres 1911 und am Anfang des Jahres 1912 erschien eine ganze Reihe von höchstinteressanten Arbeiten von Osborne und Mendel<sup>(1)</sup> und Hopkins,<sup>(2)</sup> die das Wachstumsproblem von einem ganz neuen Standpunkt aufnahmen. Diese Autoren zeigten, daß auf einer künstlich zusammengesetzten Diät, die z. B. aus Casein, Fett, Stärke, Zucker und Salzen bestand, junge Ratten zwar eine lange Zeit am Leben erhalten blieben, aber das Wachstum total einstellten. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, daß ein Zusatz von frischer Milch (Hopkins) oder eines Milchpräparates (Osborne und Mendel) bei den Tieren das Wachstum wieder normal gestaltete.

Da die obige Versuchsnahrung in ihrer Zusammensetzung die nötigen Bestandteile in genügendem Maße enthielt, so war es im voraus klar, daß die fehlende Substanz kein Protein, Fett, Kohlenhydrate und Salze sein kann, sondern ein bisher entgangener Bestandteil der Nahrung sein muß, der offenbar in der benutzten Diät fehlt. Von diesen Autoren, und ebenfalls von McCollum und Davis,<sup>(3)</sup> der später hinzutrat, ist eine große Anzahl von Versuchen angestellt worden, um die chemische Natur dieses fehlenden Bestandteils der Nahrung näher zu definieren, die jedoch das Problem bis jetzt nicht zu lösen vermochte.

Zu gleicher Zeit mit diesen Wachstumversuchen trat ein Wendepunkt in der Beriberifrage ein; es wurde gezeigt, daß die Nahrung außer den bekannten Bestandteilen noch eine Gruppe von bisher unbekanntem Substanzen enthält, die für das Leben teils unentbehrlich, teils nützlich sind. Diese Substanzen, die unter dem Namen, Vitamine gruppiert worden sind und deren Studium sich erst im Anfangsstadium befindet, haben schon jetzt eine ganze Reihe von chemischen und physiologischen Problemen eröffnet und sind wahrscheinlich auch berufen, ein neues Licht auf die Wachstumsfrage zu werfen. Wie weit diese von einem von uns (C. F.) verteidigte Ansicht<sup>(4)</sup> mit den bisher bekannten Tatsachen im Einklang steht, wird in dieser Arbeit gezeigt.

Bevor wir aber dies tun, müssen wir auf einige Phasen der Wachstumsfrage näher eingehen. Aus den Arbeiten von Osborne und Mendel ist es offensichtlich, daß diese Autoren zuerst daran dachten, daß in der Nahrung, bei der die Ratten kein Wachstum zeigten, es sich um Fehlen oder zu geringe Menge gewisser Aminosäuren handelt. Sie haben sich aber bald überzeugt, daß dies nicht der Fall ist, indem sie statt Milch proteinfreie, d. h. von Proteinen befreite Milch anwandten, mit der sie zur damaligen Zeit über sehr gute Resultate berichteten. Eine andere Arbeit dieser Autoren<sup>(5)</sup> hatte zum Ziele zu beweisen, daß die Lipide der Nahrung, insbesondere die in Äther lösliche Fraktion beim Wachstumsvorgang keine Rolle spielt. Später ersetzten sie die proteinfreie Milch durch anorganische Salze, die in ihrer Zusammensetzung diejenigen der proteinfreien Milch nachahmte.<sup>(6)</sup> Auch mit diesem Präparat berichteten sie damals über sehr gute Resultate, die aber von Hopkins und Neville<sup>(7)</sup> nicht bestätigt werden konnten. Inzwischen ist eine Arbeit von McCollum und Davis (l. c.<sup>(8)</sup>) erschienen, die wieder die ganze Aufmerksamkeit auf die Fettfraktion lenkte. Diese letzten Autoren haben gezeigt, daß Butter wie auch der Ätherextrakt aus Eigelb ein vorzüglich wachstumförderndes Mittel sind. Diese Angaben sind auch vor kurzem von Osborne und Mendel<sup>(9)</sup> bestätigt und erweitert worden. Sie haben die Butter durch

Zentrifugieren gereinigt und fanden, daß solche Butter stickstofffrei ist und doch wachstumfördernd wirkt. Sie sahen darin den Beweis, daß die Wachstums substanz nichts mit den Vitaminen gemein hat.

An dieser Stelle greifen unsere Versuche ein. Der eine von uns (Casimir Funk<sup>(9)</sup>) konnte zeigen, daß die Zusammensetzung der Nahrung, die für die Wachstumsversuche an Ratten angewandt wurde, vitaminfrei ist, d. i., daß Tauben mit dieser letzten gefüttert an typischer Beriberi zugrunde gehen.

Wir haben ferner die Butterversuche wiederholt. Zuerst gingen wir an die Reinigung der Butter und verfahren zuerst genau nach der Vorschrift von Osborne und Mendel. 12 kg bester normandischer Butter wurde bei 45° geschmolzen und 30—40 Minuten in einer Zentrifuge mit großer Tourenzahl (6500 pro Minute) zentrifugiert und das geschmolzene Fett abpipettiert. Wir erhielten auf diese Weise eine Fettfraktion, eine trübe wässerige Schicht und einen festen Rückstand, der aus Epithelzellen, Haaren und Schmutz bestand.

Die wässerige Lösung, die 1300 ccm betrug, wurde durch eine Wattaeschicht filtriert. Die Flüssigkeit hatte einen käsigen Geruch und wurde mit 2 Volumen Alkohol gefällt, worauf ein gelatinöser Niederschlag ausfiel (verändertes Casein?). Dieser wurde abzentrifugiert und das Filtrat im Vakuum auf 290 ccm eingeeengt, die Lösung durch ein nasses Filter filtriert. Von dieser Lösung wurde 10 ccm für die Bestimmung des Stickstoffs angewandt. Diese brauchten zur Neutralisation 55,0 ccm  $n_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Die Gesamtmenge der Lösung enthielt somit 2,23 g Stickstoff.

Das Butterfett wurde dagegen auf folgende Weise weiter gereinigt. Das Fett wurde wieder bei 40—45° C. geschmolzen und in Portionen von 500 ccm mit 500 ccm Aceton versetzt und die Mischung in 2 Liter Wasser, das  $\frac{1}{2}$ ‰ HCl enthielt, hineingegossen. Es bildete sich eine feine Emulsion, die eine halbe Stunde auf der Schüttelmaschine gehalten wurde. Die wässerige und die fettige Schicht wurden dann bei 37° C. im Scheidetrichter getrennt und das wässerige Extrakt durch ein nasses Filter filtriert. Die Lösung wurde dann bei niedriger

Temperatur im Vakuum auf 150 ccm eingengt, durch ein nasses Filter filtriert. Die Lösung, die klar war und von orange Farbe war und stark nach HCl roch, wurde auf 200 ccm aufgefüllt.

10 ccm dieser Lösung ergaben nach Kjeldahl 0,8 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , die Kontrolle brauchte 0,2 ccm. Die Gesamtlösung enthielt demnach 0,0168 g Stickstoff.

20 ccm dieser Lösung wurden in einem flachen Boot im Vakuumexsikkator bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde mit feinem CuO gemischt und nach Dumas verbrannt. Es wurden 1,6 ccm N bei  $19^\circ$  und 756 mm erhalten. Die Gesamtlösung enthielt somit 0,0234 g Stickstoff.

Die Lösung lieferte mit dem Harnsäurereagens von Folin und Macallum keine Reaktion, dagegen aber eine blaue Färbung mit dem Phenolreagens von Folin und Denis, auch mit Phosphorwolframsäure wurde eine Fällung erhalten, deren Menge aber nicht genügte, um eine Untersuchung durchzuführen.

Das so gereinigte Butterfett wurde einer weiteren Extraktion unterworfen. Auch der nächste Extrakt enthielt, wie wir sehen werden, noch immer stickstoffhaltige Substanzen. Je 1 kg von gereinigtem Butterfett wurde mit 1500 ccm einer  $1/2\%$ igen HCl am Rückflußkühler 6 Stunden gekocht. Das Fett wurde daraufhin von der wässrigen Lösung getrennt und die letzte im Vakuum bei niedriger Temperatur auf 200 ccm eingengt, wobei ein Teil der Substanz sich krystallinisch abschied.

10 ccm der Lösung brauchten 0,7—0,2 ccm (Kontrolle)  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ . Die Gesamtlösung enthielt somit 0,014 g Stickstoff.

20 ccm in der oben geschilderten Weise nach Dumas verbrannt gaben 1,9 ccm N bei  $20^\circ$  und 756 mm. Die Gesamtlösung enthielt demnach 0,022 g Stickstoff.

Die Lösung gab die Harnsäure- und Phenolreaktion und lieferte mit Phosphorwolframsäure einen Niederschlag.

Die obigen Zahlen sollen beweisen, daß es sehr schwer oder vielleicht unmöglich ist, die Butter von stickstoffhaltigen Substanzen völlig zu befreien. Mit dieser gereinigten Butter haben wir im Vergleich mit nicht behandelter Butter Tierexperimente an Ratten angestellt. Hier sind wir auf große



Schwierigkeiten gestoßen, die allerdings aus den bisherigen Arbeiten anderer Autoren über das Wachstum der Ratten nicht vorauszusehen waren.

Unsere Versuche wurden in der Mitte des Winters begonnen. Die Nahrung bestand aus:

Casein 22 0/0,

Stärke 42 0/0,

Rohrzucker 21 0/0,

Speck 12,4 0/0,

Mischung von Salzen 2,6 0/0 (in neuer Zusammensetzung von Osborne und Mendel<sup>(10)</sup>).

Das Casein wurde, da es nach unseren Versuchen immer Vitamine enthält, mit größerer Menge absoluten Alkohols am Rückflußkühler 6 Stunden extrahiert. In späteren Versuchen wurde der Speck eine Stunde lang im Autoklaven auf 150° erhitzt. Wir haben unsere Versuche bis jetzt auf 318 Ratten gemacht, doch ist uns bis jetzt an Winterratten noch nicht gelungen, die Tiere länger wie 47 Tage am Leben zu erhalten. Die Tiere starben alle mit heftiger Diarrhöe und Appetitlosigkeit, also einem Krankheitsbild, das den bekannten Avitaminosen andere Tiere nahesteht. Immerhin konnten wir die Beobachtung machen, daß die Tiere an Butter, die nach unserer Methode gereinigt wurde, eine größere Sterblichkeit zeigten, als die Tiere an genuiner Butter. Bisher also haben wir den rettenden Effekt der Butter bei den Winterversuchen nicht beobachten können. Vor kurzem haben wir wieder neue Versuche mit Frühlingsratten angefangen, die anscheinend etwas besser verlaufen, wir werden bald über diese letzten Versuche berichten.

Hier kommen wir auf eine prinzipiell wichtige Frage, die schon früher von einem von uns (C. F.) besprochen wurde (l. c.),<sup>(4)</sup> nämlich ob Ratten überhaupt längere Zeit auf vitaminfreier Nahrung leben können. Diese, früher von Osborne und Mendel verfochtene Ansicht wurde immer von uns angezweifelt, da sonst den Ratten unter den allen bis jetzt in dieser Hinsicht untersuchten Tieren eine Ausnahmestellung zukommen müßte. Sie müßten nämlich die Fähigkeit besitzen, die Vitamine zu

synthetisieren. Schon die Tatsache, daß neuerdings Osborne und Mendel in ihren Versuchen über den Einfluß der Aminosäuren<sup>(11)</sup> und Lebertran und anderer Fette<sup>(12)</sup> auf das Wachstum der Ratten konstant proteinfreie Milch und zwar in einer Menge von 18% der Gesamtnahrung zusetzen, machen es sehr wahrscheinlich, daß auch Ratten ohne Vitamine nicht leben können. Merkwürdigerweise scheinen Osborne und Mendel die proteinfreie Milch nur als Zusatz von Salzen zu betrachten. Dagegen konnte der eine von uns (C. F.<sup>(13)</sup>) zeigen, daß die proteinfreie Milch 20—40 mg Stickstoff (Reststickstoff) nach Kjeldahl enthält, von welcher Menge ein großer Teil beim Zentrifugieren in den fettigen Teil (Butter) übergeht. Schon früher konnte der eine von uns zeigen (C. F.<sup>(14)</sup>), daß Milch Vitamine enthält.

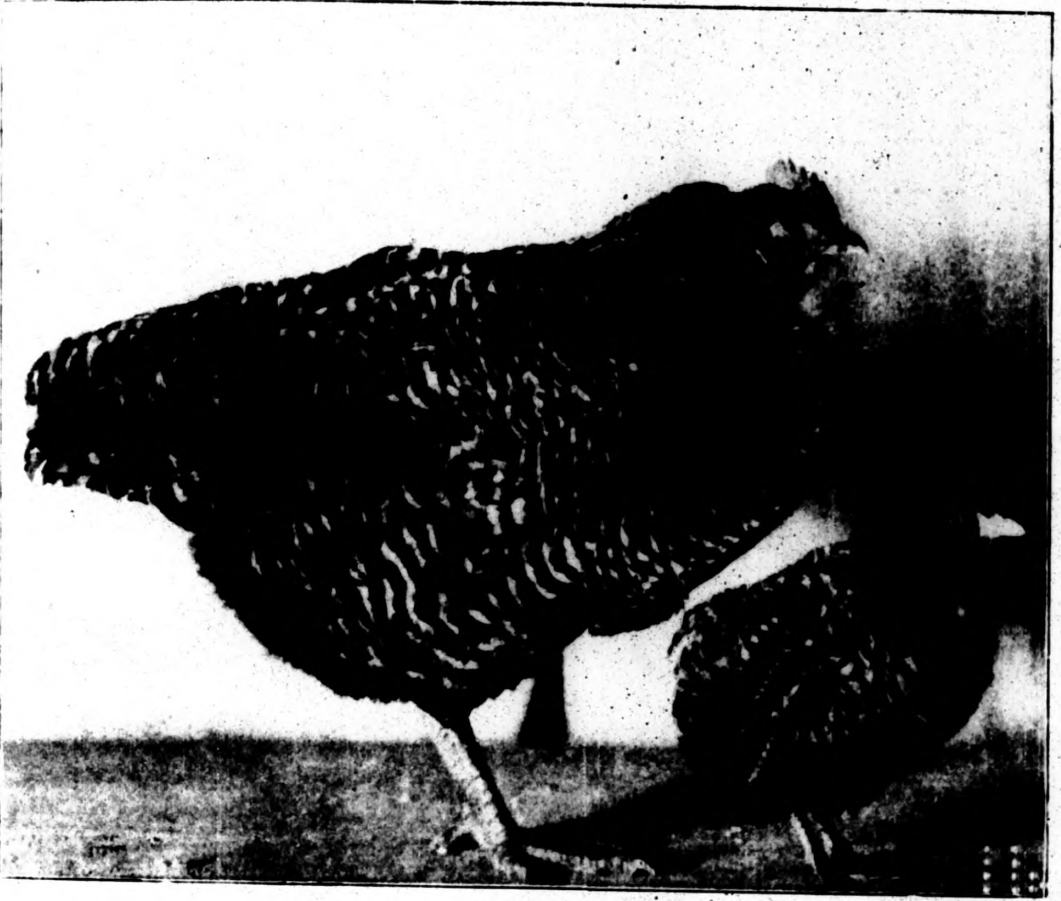
Wenn also Osborne und Mendel den Einfluß des Lebertrans auf das Wachstum studieren und dabei als Standard eine Nahrung benutzen, die in ihrer Zusammensetzung proteinfreie Milch enthält, so arbeiten sie immer mit 2 Unbekannten x und y, deren Einfluß aufeinander wir leider nicht kennen.

Es ist klar, daß das Studium der Wachstumsvorgänge ein besonders kompliziertes Problem darstellt. Wir haben hier mit vielen Faktoren zu tun. Zuerst muß natürlich die Standardnahrung alle gewöhnlichen Bestandteile (Aminosäuren, Salze usw.) in genügender Menge enthalten. Dazu kommt noch die Appetitfrage: die Nahrung kann wohl in ihrer Zusammensetzung komplett sein, frißt aber das Tier nicht genug davon, so kann es natürlich nicht wachsen. Dazu kommt noch der Einfluß der Jahreszeit, wie wir schon oben gesehen haben. Aus allem Gesagtem scheint unsere Auffassung berechtigt, daß das Wachstumsproblem eng mit dem Vitaminproblem verknüpft ist. Es ist nämlich nicht unwahrscheinlich, daß Spuren von Vitaminen, die aus der Nahrung nur schwer oder vielleicht gar nicht zu entfernen sind, die Tiere am Leben zu erhalten vermögen. Wird ein Überschuß von Vitaminen verabreicht, so tritt Wachstum ein. Wenn wir hier von Vitaminen sprechen, so meinen wir natürlich nicht, daß es sich hier gerade um dieselben Substanzen handelt, die bei der Verhütung von Beriberi eine

Rolle spielen. Wir können nämlich schon einige Typen von Vitaminen, die bis jetzt chemisch noch nicht näher untersucht worden sind, nämlich Vitamine, die nur in frischen, wasserhaltigen Nahrungsstoffen, z. B. Gemüse und Früchten enthalten sind, wir kennen auch solche Vitamine, die in fettreichem Ausgangsmaterial vorhanden sind. Zu dieser letzten Gruppe gehört wohl Butter und manche von den bisher untersuchten Ölen. Wir sind dabei den Einfluß von gereinigten Vitaminen verschiedener Herkunft auf das Wachstum der Tiere zu untersuchen und hoffen bald darüber berichten zu können.

Bei unseren Untersuchungen wollen wir uns mit einer einzigen Tierart nicht begnügen. Wir haben bereits Hühner in unseren Wirkungskreis herangezogen. Der eine von uns (C. F. <sup>(15)</sup>) hat vor kurzem darüber einige Versuche mitgeteilt, die zeigen, daß junge Hühner auch auf vitaminhaltiger Nahrung (unpoliertem Reis) nicht wachsen. Wir wollen vorläufig außer acht lassen, ob es sich dabei um Appetitfrage handelt. Wir sind nämlich bei den Hühnern zu der Anschauung gekommen, daß diese Tiere zum Wachstum und Gedeihen unbedingt frischer Nahrungsmittel bedürfen (Würmer usw.). Beim Mangel dieser entwickelt sich bei ihnen eine rachitisartige Erkrankung, deren Entstehung früher auf engen Raum, Bewegungshinderung usw. zurückgeführt wurde. Wir glauben somit, daß bei den verschiedenen Tiergruppen das Wachstumsproblem ein neues Problem darstellt. Die jungen Hühner können die ersten 2 Monate sehr gut auf trockener Nahrung gedeihen, erst später kommen die Rachitissymptome zum Vorschein.

Unsere Auffassung, daß bei verschiedenen Tierarten das Wachstum ein anderes Problem darstellt, wird bekräftigt in einigen Versuchen, die wir mit Lebertranzusatz zum unpolierten Reis bei Hühnern machten. Während Hühner auf unpoliertem Reis nicht länger als 2 Monate leben können, ist es gelungen, dieselben durch Lebertranzusatz dauernd am Leben zu erhalten. Während aber Osborne und Mendel bei Ratten über sehr gute Erfolge mit Lebertran berichten, wirkt der letzte Zusatz auf Hühner sehr günstig, regt aber das Wachstum nicht an. Die beigelegte Photographie zeigt ein solches Huhn



7 monatliche Hühner bei normaler Nahrung und bei Ernährung  
mit unpoliertem Reis und Lebertran.

Gewicht 2500 g

Gewicht 160 g



im Vergleich zu einem normal ernährten desselben Alters. Das Gewicht dieses nun 7 Monate alten Vogels, der nur von unpoliertem Reis und Lebertran ernährt wird, ist seit 5 Monaten konstant 150—160 g, das Gewicht also eines Huhnes im Alter von 5—6 Wochen. Das Tier wuchs die ersten paar Wochen ein wenig, bis die Beobachtung gemacht wurde, daß es Fliegen fängt. Als die Käfige mit Gaze bedeckt wurden, wurde das Wachstum total eingestellt. Es ist interessant zu bemerken, daß die Federn und der Schnabel normal wachsen, das Tier zeigt keine sekundär-sexuelle Merkmale und hat die Stimme eines vierwöchentlichen Tieres. Unsere Arbeit zusammenfassend möchten wir nochmals auf die engen Beziehungen zwischen dem Wachstum der Tiere und Vitamingehalt der Nahrung hindeuten; die Untersuchung dieser Beziehungen ist das Ziel unserer weiteren Arbeiten.

#### Literatur.

1. Osborne u. Mendel, Publications of the Carnegie Inst. of Washington, Nr. 156.
  2. Hopkins, Journ. of Physiol., Bd. 44, S. 425, 1912.
  3. McCollum und Davis, Journ. of Biolog. Chem., Bd. 15, S. 167, 1913.
  4. Casimir Funk, Die Vitamine. Bergmann, Wiesbaden 1914.
  5. Osborne, Mendel und Ferry, Journ. Biol. Chem., Bd. 12, S. 81, 1912.
  6. Dieselben, Diese Zeitschrift, Bd. 80, S. 307, 1912.
  7. Hopkins und Neville, Biochem. Journ., Bd. 7, S. 97, 1913.
  8. Osborne und Mendel, Journ. biol. Chem., Bd. 16, S. 423, 1913.
  9. Casimir Funk, Diese Zeitschrift, Bd. 89, S. 376, 1914.
  10. Osborne und Mendel, Journ. biol. Chem., Bd. 15, S. 311, 1913.
  11. Dieselben, Journ. biol. Chem., Bd. 17, S. 325, 1914.
  12. Dieselben, Journ. biol. Chem., Bd. 17, S. 401, 1914.
  13. Casimir Funk, Biochem. Journ., Bd. 7, S. 211, 1913.
  14. Derselbe, Journ. of Physiol., Bd. 45, S. 75, 1912.
  15. Derselbe, Diese Zeitschrift, Bd. 88, S. 352, 1913.
-