



Mælkens caseiner er uden indre orden – men hvad gør calcium?

Når calcium bindes til caseiner for biologisk transport, øges entropien, og orden mindskes tilsyneladende. Dissociation af calcium fra casein har endda negativ aktiveringsenergi. Ikke-ligevægtstermodynamik forklarer disse usædvanlige effekter af temperatur på orden og uorden under calciumtransport.

Af Leif H. Skibsted, Institut for Fødevarevidenskab, Københavns Universitet

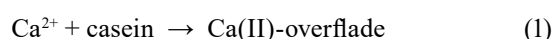
Transport af calcium og fosfat til biomineralisering hos pattedyrs afkom afhænger af såkaldte "Intrinsically Disordered Proteins". Caseiner er sådanne IDP, som det er vist i figur 1 for β -casein.

Knogler og tænder hos pattedyr består af det tungtopløselige hydroxyapatit, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, HAP, der transporteres ved binding af calcium og fosfat til caseiner, se figur 2, side 14. En

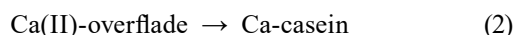
række caseiner har forskellig evne til at binde og transportere calcium: $\alpha_{S2} > \alpha_{S1} > \beta > \kappa$ med fra 8-9 calcium for α -caseinerne til 4-5 calcium for β -casein og 1 calcium for κ -casein [1].

Termodynamik af calciumbinding

Binding af calcium til casein er en totrinsproces med en indledende hurtig bimolekylær reaktion med en hastighed næsten uafhængig af temperaturen:



Andet trin er en langsommere første orden omlejring med en hastighed, der øges med temperaturen [2]:



Calciumioners binding til casein og caseinater er endoterm med $\Delta H^0 > 0$ på samme måde som binding til laktat og andre anioner typiske for mælk, som det fremgår af tabel 1, side 14, hvor også K_{kompleks} er defineret. Det er usædvanligt, at kompleksdannelse er en endoterm proces og dermed kontrolleret af tilvækst i entropien med $\Delta S^0 > 0$:

$$-RT \ln K_{\text{kompleks}} = \Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \quad (3)$$

Endoterm binding af calcium i mælk giver sig til kende som øgning af koncentration af frie calciumioner, når den friske mælk afkøles efter malkning [2,3].

Calcium bindes til mælkens bestanddele som hydroxycarboxylater, caseiner, fosfater og o-fosfoserin med $\Delta H^0 > 0$ [3]. Calcium bindes derimod til aminosyrerne glutamat og aspartat exotermt med $\Delta H^0 < 0$ [4,5].

Calciumioner bindes derfor tilsyneladende til caseinerne gennem o-fosfoserin-sidekæder snarere end gennem glutamat- og aspartat-sidekæder [5]. Binding af calciumioner til caseinerne er således entropikontrolleret, da $\Delta H^0 > 0$ og $\Delta S^0 > 0$. Overraskende må det derfor konkluderes, at binding af calciumioner mindsker caseinerne orden i opløsning.

Calcium bindes i caseinerne til o-fosforsyreestre af serin-sidekæder, men findes også som indesluttede CaHPO_4 nanokrystaller [6,7]. De to typer calciumfosfat blev tidligere tilsammen benævnt "colloidal calcium phosphate" eller CCP, en betegnelse, der i dag bør forlades [7].

Kinetik af calciumbinding

De to typer calcium bundet i caseiner giver sig også til kende som to trin i dissociation af calcium fra caseiner [6]. Den mere reaktive del af calcium er bundet til o-fosfoserin og dissocieres hurtigt og parallelt med en langsommere reaktion for nanokrystallerne. Begge reaktioner foregår dog hurtigere ved lav temperatur formelt svarende til en negativ aktiveringsenergi

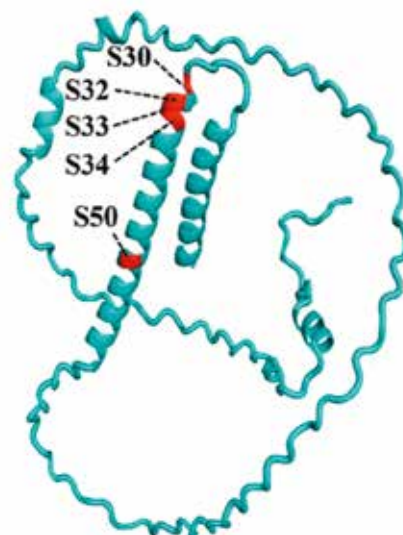
Hvem var De Donder?

Théophile Ernest De Donder (1872-1957) var en belgisk kemiker og regnes som grundlæggeren af irreversibel termodynamik, også kaldet ikke-ligevægtstermodynamik. De Donders teori forklarer, hvorfor komplekse reaktioner kan være sammensat af elementarreaktioner, der tilsyneladende ikke opfylder kravet om mikroskopisk reversibilitet.

Binding og fraspaltning af calcium til og fra casein, som fremstillet i figur 3, er i direkte modstrid med det fundamentale termodynamiske princip om mikroskopisk reversibilitet. Binding og fraspaltning af calcium går ad forskellige reaktionsveje og har forskellige overgangstilstande eller "transition states" på engelsk.

De Donders ligninger forklarer dette paradoks ved, at en af reaktionsvejene bliver så langsom, at en anden reaktionsvej tager over, og teorien anvendes til at forklare kemisk katalyse. Her anvendes princippet nu til at forklare, hvorfor aktiveringsenergien for calcium-dissociation bliver negativ, og hvorfor binding af og fraspaltning af calcium tilsyneladende ikke opfylder kravet om mikroskopisk reversibilitet [2,9].

Figur 1. β -casein binder calciumioner ved de 5 o-fosfoserin markeret som S. Det viste protein er et forstadium, hvis struktur er genereret ved hjælp af AlphaFold Protein Structure Database [8]. β -casein dannes ved hydrolytisk fraspaltning af et 15 aminosyrer langt peptid. I det viste protein er aminosyren methionin N-terminal. I β -casein bliver arginin N-terminal. Glutamat i position 57 binder calcium for højere fri calcium-koncentrationer [4].



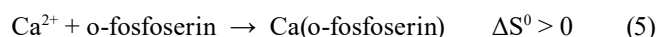
på -22 kJ/mol for den hurtigere reaktion og -48 kJ/mol for den langsomme reaktion [6].

β -casein binder 4 calcium til o-fosfoserin i position 30, 32, 33 og 34 nær proteinets N-terminal, som det er vist i figur 1 [8]. Ved flere calcium end 4 bundet til hvert casein dannes langsomt en casein-gel, der også involverer calciumbinding til glutamat-sidekæder [4].

En femte calciumion bindes tilsyneladende til en glutamat-sidekæde, Glu, i position 57 i proteinet:



Denne kompleksbinding er exoterm i modsætning til calciums binding til o-fosfoserin-sidekæderne, som er endoterm:



som det fremgår af tabel 1, side 14.

Ved dissociation af calcium fra caseiner, som overordnet er en exoterm proces, vil calcium skulle flyttes fra glutamat-sidekæden til en o-fosfoserin-sidekæde i en proces, der ifølge tabel 1 stort set er atermal. Denne flytning af calcium er derfor entropikontrolleret. En ringe temperaturafhængighed af hastigheden for calciumdissociation sammen med stigende binding af calcium ved stigende temperatur er i overensstemmelse med, at overgangstilstanden #1 i figur 3, side 14, ligner reaktantsiden for sidste trin i dissociationen mere end produktsiden [2].

Ikke-ligevægtstermodynamik

Binding og dissociation af calcium, som reaktionerne er vist i figur 3, er i modstrid med princippet om mikroskopisk reversibilitet, da den fremadrettede og tilbagegående reaktion angives at forløbe gennem forskellige overgangstilstande. De Doner forklarede dette paradoks, som også ses for katalytiske processer, ved, at et reaktionstrin bliver så langsomt, at andre reaktionsveje bliver dominerende, så reaktionen overordnet vil blive opfattet som cyklisk med en reaktionsvej for den fremadrettede reaktion, der er forskellig fra den modsatrettede reaktion [9].

Det blev derfor foreslået, at calciumbinding til β -casein udgør en irreversibel cyklus og dermed tilsyneladende er i modstrid med princippet om mikroskopisk reversibilitet [2]. Sådanne asymmetriske reaktioner med flere reaktionsveje kan forklares ved hjælp af De Doners uligheder for lukkede kredsløb [9]. Forklaringen synes at være, at calciumtransport fra en glutamat-sidekæde med svagere binding til en o-fosfoserin-sidekæde er irreversibel, da calcium bindes stærkere til

Tabel 1. Termodynamik for binding af calcium(II) til caseiner og anioner typisk for mælk ved 25°C [5,7].

Ligand (L)	K_{kompleks} M^{-1}	ΔH^0 $kJ\ mol^{-1}$	ΔS^0 $J\ mol^{-1}K^{-1}$
Laktat	49	31	135
Gluconat	88	34	150
Lactobionat	140	29	137
Glutamat	5	-21	-57
Aspartat	6	-17	-46
Citrat	4000	-5	-70
o-fosfoserin	29	16	79
α -casein	6000	16	125
caseinat	2800	40	200
$H_2PO_4^-$	26	14	75
HPO_4^{2-}	681	14	95
PO_4^{3-}	$2,9 \times 10^6$	13	168

Komplekskonstanten er defineret som $K_{\text{kompleks}} = [CaL^+]/[Ca^{2+}][L^-]$.

o-fosfoserin end til glutamat [7]. Hermed opstår en triangulær reaktion, hvor det tilbagegående trin fra o-fosfoserin til glutamat-sidekæderne kan negligeres i en tilsyneladende ikke-reversibel flytning af calcium fra glutamat til o-fosfoserin.

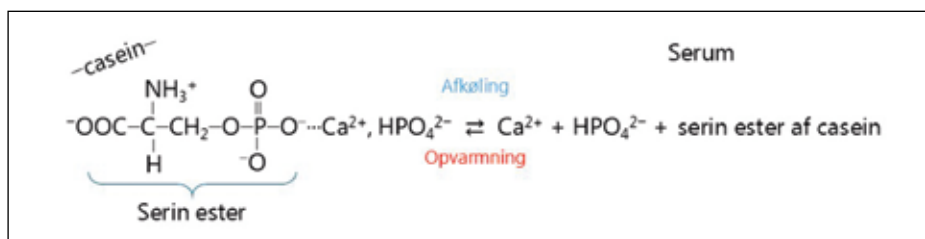
Dette irreversible trin i β -caseins interne calciumtransport betyder, at dissociation af calcium sker efter en atermal flytning af calcium fra glutamat til o-fosfoserin. Dissociation af calcium fra o-fosfoserin i casein er exoterm, og den reaktive del af calcium bundet til o-fosfoserin i caseiner mindskes ved højere temperatur. Lavere temperatur øger derfor graden af dissociation, hvis det antages, at der kun er lille forskel i struktur af overgangstilstanden for dissociation og struktur af en delvis dissocieret calcium o-fosfoserin.

Calcium dissocierer exotermt fra binding til o-fosfoserin, hvilket betyder, at ved lavere temperatur er calcium bundet løsere til o-fosfoserin forud for dissociation. Dissociation bliver nemmere, og den observerede hastighed bliver højere ved lav temperatur svarende til en negativ aktiveringsenergi for calciumdissociation [6].

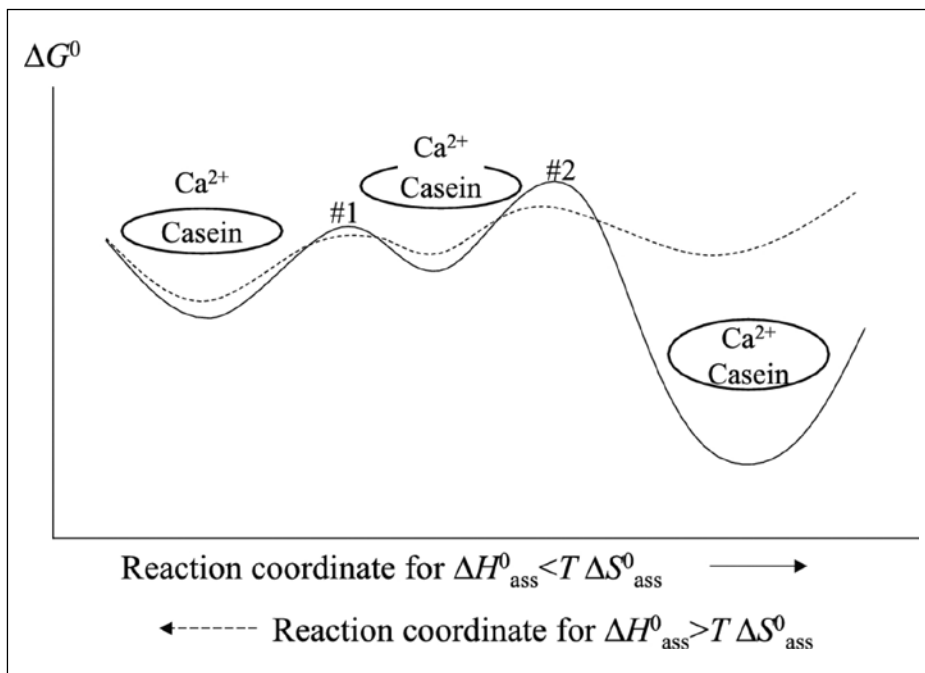
Calcium bindes initielt til glutamat i en exoterm binding og flyttes i en atermal entropikontrolleret proces til o-fosfoserin, hvorfra dissociation er exoterm og foregår derfor ved lavere hastighed for højere temperatur med stærkere binding af calcium svarende til den negative aktiveringsenergi.

Biologisk betydning

Den positive entropi for binding af



Figur 2. Binding af calciumioner til caseiner er usædvanlig ved at være endoterm og dermed entropikontrolleret [7].



Figur 3. Calciumbinding til caseiner indledes med binding af calcium til caseiners overflade i en hurtig bimolekylær reaktion med overgangstilstanden eller transition state #1. Næste trin via #2 er langsommere, og hastigheden har større temperaturafhængighed. Overgangstilstanden for binding og fraspaltning af calcium er forskellige i modstrid med princippet om mikroskopisk reversibilitet. Gengivet fra reference [2] med tilladelse fra Springer Nature.

calciumioner til caseiner og caseiners byggestene som o-fosforer og fosfater er med til at gøre caseinerens funktion mere effektiv som bærere af calcium omkring fysiologisk temperatur.

Calciums kompleksbinding er typisk elektrostatisk snarere end covalent og involverer frigivelse af vand bundet til calcium. Calcium(II)-ioner i vand er normalt omgivet af 8 vandmolekyler. I nogle salte er koordinationstallet dog 6.

I salte af calcium som hydrater af calciumcitrat findes vand bundet med to forskellige affiniteter. Tilsvarende kan frigivelse af vand ved calciumioners binding til caseiner forklare den øgede entropi ved frigivelse af flere molekyler vand for hvert molekyle calcium. Dette fænomen er med til at fremme calciumbinding og transport, selv om calciumbinding ved fysiologisk temperatur er endoterm. Den fysiologiske effekt af den positive ændring i entropien for calciumtransport bundet til casein genfindes i den afpassede temperatureffekt for calcium association og dissociation. Den tilsyneladende

negative aktiveringsenergi for calciums dissociation fra caseiner med dens betydning for optag af calcium under fordøjelse af mælk synes nu forklaret ud fra entropikontrollerede hindringer i intern transport af calcium i caseiner med skiftende endoterm og exoterm binding til protein-sidekæder. Nye eksperimentelle metoder vil med fordel kunne udvikles til at studere kinetikken for binding af calcium i forskellige positioner i de enkelte caseiner.

E-mail:

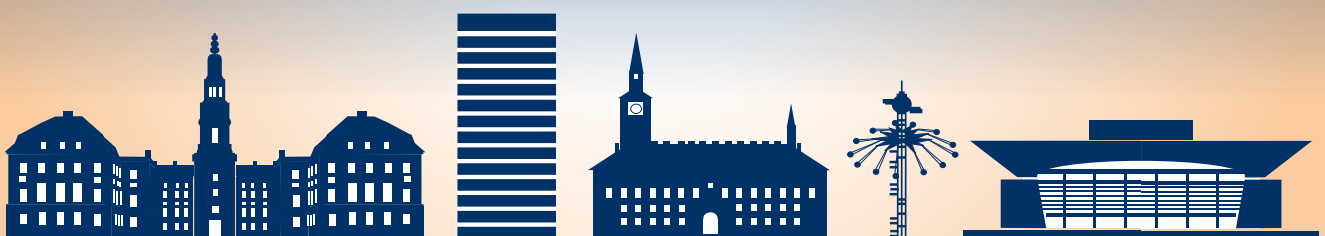
Leif H. Skibsted: ls@food.ku.dk

Litteratur

- Holt, C. (2016). Casein and casein micelle structures, functions and diversity in 20 species. *International Dairy Journal* 60, 2-13.
- Skibsted, L.H. (2024). Perspective of non-equilibrium thermodynamics of calcium transport by caseins. *European Food Research and Technology* 250, 15-20.
- Liu, X.-C., Jiang, Y., Ahrné, L.M. & Skibsted, L.H. (2022). Temperature effects on calcium binding to caseins. *Food Research International* 154, 110981-110991.
- Wang, W.-Z., Li, S., Li, X.-Y., Yao, S.-P., Wu, J., Han, R.-M., Dong, G. & Zhang, J.-P. (2025). Dynamics of Ca(II)-induced aggregation of β -casein as an intrinsically disordered protein: Effect of Ca(II) concentration and encapsulation of bioactive molecules. *Biomacromolecules* 26, 6773-6786.
- Liu, X.-C., Liu, J. & Skibsted, L.H. (2022). Temperature effect on calcium binding to aspartate and glutamate. *Food Research International* 159, 111625.
- Jiang, Y., Barone, G., Rauh, V., Lillevang, S.K., Skibsted, L.H. & Ahrné, L. (2023). Temperature effects on calcium partition kinetics in pasteurised skim milk during storage. *International Dairy Journal* 137, 185518.
- Liu, X.-C. & Skibsted, L.H. (2022). Advances in understanding milk salts. In Thom Huppertz & Todo Vasiljevic (editors) *Understanding and improving the functional and nutritional properties of milk*, Burleigh Doods Science Publishing, Cambridge, UK. Chapter 13.
- Varadi, M. et al. (2022). Alpha Fold Protein Structure Database: massively expanding the actual coverage of protein-sequence space with high accuracy models. *Nucleic Acids Research* 50, D439-D444.
- Holstein, W.L. & Boudart, M. (1997). Application of the De Donder relation to the mechanism of catalytic reactions. *Journal of Physical Chemistry B* 101, 9991-9994.

LabDays 2026

- trade fair for laboratory technology



COPENHAGEN, KB HALLEN
9 - 10 SEPTEMBER