

# **The Effect of Milk and Fermented Milk on High Blood Pressure and Bone Mineralization**

Riitta Korpela, Tiina Jauhiainen, Mirkka Narva

---

University of Helsinki, Institute of Biomedicine  
Foundation for Nutrition Research Valio Ltd



# **The Effect of Milk and Fermented Milk on High Blood Pressure and Bone Mineralization**

Riitta Korpela, Tiina Jauhiainen, Mirikka Narva

University of Helsinki, Institute of Biomedicine  
Foundation for Nutrition Research Valio Ltd

## **I. High blood pressure**

### ***Epidemiological studies***

Epidemiological studies suggest that consumption of milk and milk product is inversely related to the risk for hypertension. The association between milk consumption and blood pressure was reported in the analysis of first National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I) (1). In this cross-sectional study with over 10000 persons, low consumption of milk products was associated with a high incidence of hypertension. The prevalence of hypertension has also been reported to be twice as high in middle-aged men in Puerto Rico who drank no milk as in middle-aged men in Puerto Rico who drank at least one litre of milk a day (2). The consumption of milk has also been shown to be lower in hypertensive than normotensive persons in American and Italian population studies (3, 4). The milk product consumption has also been shown to relate to the risk of stroke. During 22-years of follow-up of 3000 men the consumption of milk was related to the lower rate of thromboembolic stroke (5). In this study and in a prospective Nurses' Health Study with 85000 American women (6) the inverse association between calcium intake and stroke was stronger for dairy calcium than for non-dairy calcium. It is therefore possible that some components of milk other than calcium e.g. other electrolytes proteins or peptides had been important in relation to the incidence of stroke. However beneficial relationship between consumption of milk and incidences of hypertension and stroke has not been seen in all studies (7, 8).

### ***Intervention studies***

Intervention studies have investigated the effects of milk and milk products on blood pressure. One of the most remarkable recent studies is the DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension) trial with almost 500 normotensive or mildly hypertensive subjects, which shows that a diet rich in fruits, vegetables and low-fat dairy products (the so-called combination diet) was shown to reduce blood pressure significantly. Mean systolic blood pressure and mean diastolic blood pressure decreased by

5.5 mmHg and 3.0 mmHg, respectively, in total study cohort. Among the hypertensive subjects the reductions were greater. Mean systolic blood pressure decreased by 11.4 mmHg and mean diastolic blood pressure by 5.5 mmHg. Blood pressure lowered more on the combination diet than on the diet rich only in fruits and vegetables (9, 10). In a follow-up study (DASH II), in which sodium intake was restricted to a maximum of 1.5 g/day, mean systolic blood pressure fell further in the normotensive subjects, by 7.1 mmHg (11).

Although it has been shown also in some other intervention studies that consumption of milk products reduces blood pressure (12-15), the relationship has not been demonstrated in all studies (16).

### ***Protein and blood pressure***

Milk contains many constituents including electrolytes, proteins and peptides, which could affect blood pressure beneficially. Milk contains about 3.5 % of protein, which is consist of caseins (80%) and whey proteins (20%). Caseins have been classified as  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins. Whey contains  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin and several minor proteins with different biological activities like enzymes, mineral binding properties, immunoglobulins (17).

Some epidemiological studies suggest that protein intake is inversely related to the risk for hypertension (18-20). In two cross-sectional studies, the Honolulu Heart Program study and the Intersalt study have shown inverse relation between protein intake and blood pressure (18, 19). Association between protein intake and the risk of stroke was also seen in Nurses' Health Study (6). However, in some epidemiological studies, no inverse relationship between high protein intake and blood pressure has been seen (21).

Also in intervention studies the effects of dietary protein on blood pressure has been investigated (22, 23). The results of some of these studies show that a high dietary protein intake was associated with a low incidence of hypertension. However, in some intervention studies no significant effects of level of protein intake on blood pressure were observed (for review, see 24).

The antihypertensive mechanism of protein is still unknown. One possibility is the degradation of protein into peptides, which have antihypertensive effects. In this review we concentrate to discuss about the blood pressure lowering effect of milk derived peptides.

## **Peptides and blood pressure**

### ***Peptide production and absorption***

Biologically active peptide fragments are formed when milk proteins are broken down by digestive enzymes, or by the proteinases formed by lactobacilli during fermentation of milk (24, 25). Lactic acid bacteria are suitable for milk fermentation because they have a proteolytic activity and capacity

to produce peptides, e.g. a starter containing *L. helveticus* strain has reported to produce bioactive peptides (26, 27). Milk peptide activities include binding to opioid receptors, inhibition of angiotensin-converting enzyme (ACE), and modification of antithrombotic and immune responses (24, 25). Phosphopeptides, formed from casein, may enhance the absorption of minerals, especially calcium, from the digestive tract into the circulation (24).

Milk peptides that are not degraded in proteolysis can theoretically be absorbed intact. It has been suggested that dipeptides and tripeptides (Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro) are absorbed in the intestine (28, 29). Val-Pro-Pro has been reported to transport via the Caco-2 cell monolayer via paracellular diffusion (29). Also the absorption of longer peptides has been studied. The ACE inhibitory peptide, lactokinin, Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg has been found to be transported intact through the Caco-2 monolayer (30).

### ***Animal studies***

Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro have been shown to reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR) after a single oral administration (27). They also prevent the development of hypertension in SHR after long-term, twelve and thirteen weeks, oral feeding (31, 32). At the end of the twelve-week treatment period systolic blood pressure was 17 mmHg lower in the group receiving *L. helveticus*LBK-16H fermented milk containing Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro than in the control group receiving water ( $p<0.001$ ) and 12 mmHg lower in the group receiving the tripeptides in water than in the control group (31). In a thirteen-week study, *L. helveticus* LBK-16H fermented milk-containing Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro tripeptides attenuated the development of hypertension more effectively than water ( $p<0.001$ ) or the *L. helveticus* and *S. cerevisiae* fermented milk containing half as much the same peptides than *L. helveticus* LBK-16H fermented milk ( $p<0.001$ ) (32). It has been shown that  $\alpha$ -Lactorphin (Tyr-Gly-Leu-Phe) lowers blood pressure dose-dependently in SHR and in normotensive Wistar-Kyoto (WKY) rats. The blood pressure was measured with continuous radiotelemetric monitoring and the maximal reductions in systolic and diastolic blood pressure were  $23\pm 4$  and  $17\pm 4$  mmHg, respectively (33). Two *L. helveticus* strains, *L. helveticus*CHCC637 and *L. helveticus* CHCC641 in fermented milk have an ACE inhibition effect. This fermented milk reduced blood pressure more than the control group in SHR (34).

### ***Clinical studies***

*Lactobacillus helveticus* fermented milk containing Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro tripeptide has also been shown to decrease systolic and diastolic blood pressure in hypertensive subjects (35-38). In a placebo-controlled study on hypertensive subjects, *L. helveticus* and *S. cerevisiae* fermented milk reduced systolic and diastolic blood pressure ( $p<0.05$ ) during the eight-week intervention more than placebo-fermented milk (35). In an eight-week placebo-controlled study on 17 hypertensive subjects

systolic and diastolic blood pressures were lowered more in the group receiving *L. helveticus* fermented milk containing Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro tripeptides than in the control group receiving normal fermented milk fermented with *Lactococcus sp.* mixed culture ( $p=0.05$  and  $p<0.05$ ) (37) and also in the long-term clinical study (21 weeks) systolic and diastolic blood pressure were decreased more in *L. helveticus* fermented milk group ( $n=22$ ) than in the control group receiving fermented milk ( $n=17$ ) (SBP  $6.7\pm 3.0$ ,  $p=0.030$  and DBP  $3.6\pm 1.9$ ,  $p=0.059$ ) (36). Tablets, containing Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro tripeptides, have been shown to decrease blood pressure in mild or moderately hypertensive subjects (39). Milk that has been fermented using *Lb. casei* and *Lc. lactis* and that contains  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) reduced blood pressure during a 12-week treatment period. Systolic blood pressure lowered more in fermented milk group than in the control group ( $p<0.05$ ), but diastolic blood pressure of the fermented milk group did not differ from the control group (40). In an other eight-week-long study systolic blood pressure was significantly lower in the group receiving yoghurt fermented with two strains of *Streptococcus thermophilus* and two strains of *Lactobacillus acidophilus* and in the group receiving yoghurt fermented with one strain of *Enterococcus faecium* and two strains of *Streptococcus thermophilus* compared to the group receiving yoghurt fermented with two strains of *Streptococcus thermophilus* and one strain of *Lactobacillus rhamnosus* (41).

## Mechanisms of the antihypertensive effects of milk peptides

### ***Angiotensin-converting enzyme inhibition***

One mechanism by which milk-derived peptides can reduce blood pressure is inhibition of ACE (26, 27, 32, 33, 42-45). This is the mechanism that has been studied most in relation to the antihypertensive effects of milk peptides. ACE is an enzyme that plays a crucial role in the function of the renin-angiotensin system (RAS). The RAS is an important regulator of blood pressure and fluid and electrolyte balance (46). In the RAS angiotensin I is converted to angiotensin II by ACE. Angiotensin II is a strong vasoconstrictor that induces release of aldosterone and therefore increases sodium concentration and furthers the blood pressure. ACE inhibitors have two effects on the renin-angiotensin system. They reduce production of angiotensin II and inhibit the degradation of the vasodilator bradykinin by Kininase II, the same enzyme as ACE.

Several antihypertensive peptides that inhibit ACE have been isolated from milk products and the ACE inhibition activity of these peptides has been determined. The  $IC_{50}$  values are the concentrations at which ACE activity *in vitro* is inhibited by 50%. The relationship between ACE inhibitory peptides and the chemical structure has not been confirmed, but it has been suggested that peptides, with hydrophobic amino acids at the C terminal position could be the most likely ACE inhibitors (47).

Peptides derived from casein by *L. helveticus* proteases have been shown to have ACE inhibitory

activities (48). ACE inhibitory activity of casein-derived tripeptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro has been shown *in vitro* (26). *L. helveticus* fermented milk-containing Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro raised plasma renin activity in SHR during long-term treatment (32). Also ACE activity in aorta of SHR was reduced after single oral administration and after long-term treatment with *L. helveticus* and *S. cerevisiae* fermented milk containing Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro tripeptides (28, 49). Antihypertensive peptides with insignificant ACE-inhibitory activity have also been isolated from milk products (33, 43, 45). Therefore milk-derived peptides could also affect blood pressure by mechanisms other than ACE inhibition.

### ***Other possible mechanisms***

Several milk peptides have opioid-like activities. Typical opioid peptides originate from three precursor proteins: pro-opiomelanocortin (endorphins), pre-enkephalin (enkephalins) and prodynorphin (dynorphins). All have the same N-terminal amino acid sequence, Tyr-Gly-Gly-Phe (25). Opioids bind to opioid receptors and have morphine-like effects. The opioid system contains several different endogenous opioid peptides and receptors. Opioids are present in the central nervous system and in peripheral tissues, where they are involved e.g. in the regulation of circulation (50). Opioids also affect blood pressure (51). Opioid-like activity has been discovered in many peptide fragments from casein and the first characterized opioid milk peptide agonist was derived from  $\beta$ -casein ( $\beta$ -casomorphin). The peptides with opioid-like activity derived from  $\alpha$ -casein are called  $\alpha$ -exorphins and from  $\gamma$ -casein derived are called casoxins. In addition opioid peptides can be derived from the whey proteins  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulins.  $\alpha$ -Lactorphin, found from  $\alpha$ -lactalbumin, has been shown to lower blood pressure in SHR. Because the antihypertensive effect of  $\alpha$ -lactorphin was completely prevented by an opioid receptor antagonist naloxone, it has been proposed that the antihypertensive effect is mediated via opioid receptors (33).

Some peptides, like caseinophosphopeptides, have also been shown to increase the solubility of calcium and enhance the absorption of calcium (52, 53) and some milk peptides have antithrombotic effects by e.g. inhibiting the aggregation of ADP-activated platelets (54). This might also have some role in the beneficial cardiovascular effects of milk-derived peptides.

## References

1. Sipola M. Effects of milk products and milk protein-derived peptides on blood pressure and arterial function in rats. Doctoral Thesis supervised by Docent Riitta Korpela, PhD, Institute of Biomedicine, Pharmacology, University of Helsinki, Finland.
2. The list of other references can be obtained from Dr. R. Korpela.

## II. Bone mineralization

### Milk protein and bone

#### *Correlations with milk consumption and bone*

Milk is a good source of several nutrients, such as protein, calcium, phosphate, magnesium, potassium and zinc that are considered important for bone health. In epidemiological studies milk consumption in childhood and during adolescence has been related to higher bone mineral density in adulthood (Sandler et al. 1865, Hirota et al. 1992, Stracke et al. 1983, Murphy et al. 1994, Soroko et al. 1994, Teegarden et al. 1995, New et al. 1997, Kalkwarf et al. 2003). This effect has been particularly established in white women (Optowsky and Bilezikian 2003). In cross-sectional studies milk intake has been shown to correlate to bone mineral density in children (Black et al. 2002), in adult men (Egami et al. 2003) and in women (Lacey et al. 1991, Tylavsky et al. 1992, Davis et al. 1996, Hawker et al. 2002).

Intervention studies show that milk and milk products increase bone mineral density in adolescents, both in girls (Chan et al. 1995, Cadogan et al. 1997, Merrilees et al. 2000) and in boys (Renner et al. 1998). In pre- and postmenopausal women, 2-4-year interventions with milk and milk products prevented the bone loss that occurred in the control group, who had no dietary intervention, although there was no increase in bone mineral density (Baran et al. 1990, Chee et al. 2003). The control groups of these intervention studies did not have adequate calcium intake, thus the result of the interventions may be the result of a higher calcium intake by the groups receiving milk products. In calcium-controlled studies, calcium supplementation and ingestion of dairy products increased bone mineral density in adolescents (Matkovic et al. 2004) and reduced bone loss in postmenopausal women (Prince et al. 1995). Dairy products have also been shown to increase not only bone mineral density but also bone growth (Matkovic et al. 2004).

The effect of milk and milk products on fracture risk has been evaluated in children and in women. It has recently been found that children with low milk intake are at higher risk of prepubertal bone fractures (Gouding et al. 2004). Higher milk consumption by women during the past 12-14 years has been shown to prevent fractures in Japanese population (Fujiwara et al. 2003). In North America retrospectively obtained information about childhood milk intake was associated with lower fracture risk in females over the age of 50 (Kalkwarf et al. 2003), but milk consumed during adulthood did not relate to fracture risk (Feskanich et al. 1997, 2003).

These results show that the consumption of milk and milk products correlates with higher bone mineral density during growth and prevents age-related bone loss. This may be the result of a higher calcium intake, in view of the fact that in western countries milk contributes 80% of dietary calcium



(Fleming and Heimbach 1994). However, there are other components in milk that may contribute to the effect on bone.

### ***Protein intake and bone***

Protein intake is important for bone health. Both inadequate and excess intakes have been postulated as having detrimental effects on bone (for reviews see Dawson-Hughes 2003, Ginty 2003). The effect of protein on bone is dependent on the intake of calcium (Meyer et al. 1997). Increase in protein intake causes increased calcium excretion through acid production, but this effect is not significant when calcium intake is adequate (Heaney 1998, Dawson-Hughes and Harris 2002, Dawson-Hughes et al. 2004). In addition to the effect on calcium, protein affects bone through insulin-like growth factor 1 (IGF-1) (for review see Bonjour et al. 1997), which regulates bone growth and bone mineral density (Yakar et al. 2002). Protein supplementation increases serum IGF levels (Schürch et al. 1998) and restriction of protein decreases IGF levels (Bourrin et al. 2000). The intake of milk has been associated with higher IGF-1 levels, possibly due to the effects of protein (Cadogan et al. 1997, Heaney et al. 1999).

Protein intake has been associated with higher bone mineral density in adults (Promislow et al. 2002), in postmenopausal women (Kerstetter et al. 2000) and in the elderly (Hannan et al. 2000, for review see Bell and Whiting 2002). The effect of protein on fracture risk is controversial (negative: Feskanich et al. 1996, Sellmeyer et al. 2001, positive: Munger et al. 1999).

### ***Whey protein and bone***

3% of milk is protein, of which 80% is casein and 20% whey protein. Whey proteins, such as alpha lactalbumin and beta lactoglobulin, bind calcium, but this has also no effect on calcium balance and retention *in vivo* (Takada et al. 1997a, for review see Gueguen and Pointillart 2000). In fact, whey protein has been shown to increase the bone-breaking energy of rats compared to casein, by increasing the total amino acid content of the femur (Takada et al. 1997a). In growing rats, a whey protein supplementation did not make any difference to femoral density, bone mineral content or the biomarkers of bone metabolism after a 7-week intervention (Kelly et al. 2003). However, in the same study the whey protein-supplemented casein diet increased bone formation after 14 days in a model of ectopic bone formation (Kelly et al. 2003), implying that the intervention was too short to demonstrate the effect on bone. These results suggest that whey protein does not increase mineral bioavailability but supports bone by increasing bone protein, especially bone collagen content.

Whey protein reduces the formation of osteoclasts and their activity (Takada et al. 1997b). Osteoclast formation measured by multi-nuclei cell formation decreased dose-dependently with the highest concentration of 1 mg/ml whey. Whey protein has also been shown to activate osteoblasts

(Takada et al. 1996).

The effects of whey protein on bone could be derived from the basic part of the protein (milk basic protein, MBP). Isolated MBP decreases bone deterioration in ovariectomised rats (Kato et al. 2000). In human studies short-term ingestion of MBP increases radial and calcaneus BMD and decreases bone resorption markers (Aoe et al. 2001, Toba et al. 2001, Yamamura et al. 2002). The active component of MBP has been found to be kininogen, belonging to high-mobility-group-like proteins (Yamamura et al. 1999, 2000). One of the mechanism by which this active compound affects bone is through cystatin C, which inhibits osteoclast activity by decreasing the secretion of collagen-digesting cathepsin (Matsuoka et al. 2002).

To summarise the effect of milk on bone, milk consumption has a positive correlation with bone mineral density. In addition to its calcium content, milk contains proteins, which are beneficial to bone health in the presence of adequate calcium.

## Milk-derived bioactive peptides on calcium and bone metabolism

In the gastrointestinal tract, food protein is digested into smaller peptides, some of which have physiological effects (for review see Korhonen and Pihlanto 2003). These bioactive peptides can be formed by enzymatic hydrolysis with digestive enzymes, but also by fermentation with starter cultures (for review see Korhonen and Pihlanto 2003). In fermentation, the formation of peptides depends on the bacteria used (Matar et al. 1996). The active peptides are usually small, consisting of 3-20 amino acid residues. Bioactive peptides have been found in many different foods, such as milk, eggs, beans, fish and corn (for review see Kitts and Weiler 2003), but milk protein is the most important source of bioactive peptides (for review see Korhonen and Pihlanto 2003).

The bioavailability of peptides most often requires that they should not be digested in the gastrointestinal tract. The absorption of small peptides is well known (for review see Fricker and Drewe 1996). Peptides can be absorbed through the gastrointestinal wall by different mechanisms, such as passive diffusion through the enterocytes, paracellularly, through cytosol or through a carrier (for review see Fricker and Drewe 1996). Some peptides, such as caseinphosphopeptides, express their activity in the gastrointestinal tract without being absorbed.

Bioactive peptides have been shown to have various physiological effects both *in vitro* and *in vivo* (for review see Pihlanto-Leppälä 1999, Korhonen and Pihlanto 2003, Maisel and FitzGerald 2003). Opioid peptides from casein or whey proteins possess an affinity to opiate receptors as well as opiate-like effects. They act either as agonists or antagonists in the opioid receptors. Opioid peptides influence the nervous system, gastrointestinal transit time, nutrient intake and the secretion of insulin and glucagons. Antithrombotic peptides derived from casein have been shown to suppress platelet aggregation. Immunomodulating peptides stimulate the proliferation of human lymphocytes and the phagocytic activities of macrophages. Antimicrobial effects have been shown with small

they proteins binding iron, an essential nutrient of micro-organisms (for review see Clare et al. 2003). Other casein-derived antimicrobial peptides have shown anticarcinogenic effects (for review see Aimutis 2004). The antioxidative and hypocholesterolemic effects of bioactive peptides have only recently been discovered (for review see Korhonen and Pihlanto 2003). One bioactive peptide may have several physiological effects, e.g. casein-derived beta-casomorphin 7 has both angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory effects and opioid-like effects (for review see Meisel and Bockelmann 1999). The only milk-derived bioactive peptides that have been studied on calcium metabolism are caseinphosphopeptides (CPP) (for review see Scholz-Ahrens and Schrezenmeier 2000).

### ***Caseinphosphopeptides (CPP)***

CPP are a large group of peptides that have a phosphoserine residue in common. Phosphopeptides are formed either from casein by proteolytic enzymes during fermentation or in the gastrointestinal tract. CPP increase calcium absorption by forming a hydrophobic complex with calcium, thus preventing the formation of insoluble calcium phosphates (Meisel and Bockelmann 1999). *In vitro* studies have shown the effects of CPP on calcium absorption by inhibiting the precipitation of calcium in the intestine (Sato et al. 1986).

In animal studies, the effect of CPP has produced inconsistent results. In most of the studies the CPP have increased calcium absorption (Mykkänen and Wasserman 1980, Lee et al. 1980, 1983, Kitts et al. 1992, Hirayama et al. 1992, Tsuchita et al. 1993, 2001, Bennett et al. 2000), but some studies failed to show any effect on calcium absorption (Brommage et al. 1991, Kopra et al. 1992). Only one study examined the effect of CPP on bone. In this study CPP was found to prevent bone loss in ovariectomised rats (Tsuchita et al. 1996).

An early as 1950 Mellander reported the first finding of the effect of CPP in humans in his study on rachitic children (Mellander 1950). Increased calcium absorption was independent of the effect of vitamin D, suggesting that CPP increase calcium absorption in the distal small intestine. In later human studies, the effect of CPP has been shown to be influenced by the calcium status of the subjects and by other nutrients affecting calcium absorption (Heaney et al. 1994, Hansen et al. 1997a, 1997b). A CPP preparation increased calcium absorption in women whose calcium absorption rate was low (Heaney et al. 1994). The effect of the addition of 1-2 g of CPP to different food products has produced conflicting results on calcium absorption. Calcium was shown to be more efficiently absorbed from rice meal compared to whole-grain whey (Hansen et al. 1997a); however, in later study CPP did not show any greater effect on calcium absorption from low or high phytate foods (1g) (Hansen et al. 1997b).

In conclusion, CPP increase calcium absorption in animal studies but the effect in humans is not conclusive.

### ***L. helveticus* fermented milk**

During fermentation, bioactive peptides with physiological effects are formed. These peptides have been shown to enhance such processes as mineral absorption. Nevertheless, there are no prior studies on the effects of bioactive peptides and bone. The aim of our study was to clarify the effect of *Lactobacillus helveticus* (*L. helveticus*) fermented milk, phosphopeptides on the bone metabolism of rats *in vivo*, on osteoblast and osteoclast precursor cells *in vitro* and on acute changes in calcium metabolism in man.

The following conclusions can be drawn from the series of studies:

1. *L. helveticus* fermented milk supports bone mineral density in growing rats and reduces bone loss in ovariectomised rats. The effect of *L. helveticus* fermented milk may be mediated through the isoleucyl-prolyl-proline (IPP) and valyl-prolyl-proline (VPP) peptides formed during fermentation.
2. The IPP and VPP peptides increase the bone formation of osteoblastic precursor cells. However, the IPP and VPP peptides given in water have no effect on bone metabolism *in vivo* in animal models.
3. *L. helveticus* fermented milk increases calcium absorption in postmenopausal women acutely. However, it does not increase calcium bioavailability, measured as the calcium content of the bones in rats.

To summarise, *L. helveticus* fermented milk increases calcium absorption and supports bone mineral density. This study suggests that *L. helveticus* fermented milk may have an additional value as part of a healthy diet in achieving high peak bone mass and in preventing bone loss during the aging process.

## References

1. Narva M. Effects of *Lactobacillus helveticus* fermented milk and milk-derived bioactive peptides (CPP, IPP and VPP) on calcium and bone metabolism. Doctoral Thesis supervised by Docent Riitta Korpela, PhD, Institute of Biomedicine, Pharmacology, University of Helsinki, Finland.
2. The list of other references can be obtained from Dr. Riitta Korpela.

# 고혈압과 뼈의 무기질 침착에 대한 우유와 발효유의 효과

Riitta Korpela, Tiina Jauhiainen, Mirkka Narva

University of Helsinki, Institute of Biomedicine  
Foundation for Nutrition Research Valio Ltd

## I. 고 혈 압

### 역학적 연구

역학적 연구들은 우유와 유제품의 소비량이 고혈압의 위험성과 역으로 관계된다고 제시한다. 우유소비와 혈압과의 관련은 미 연방정부의 1차 보건영양조사 분석(First National Health and Nutrition Examination Survey)에서 보고되었다(1). 피실험자 만 명 이상의 횡단연구에서 유제품의 낮은 소비량은 고혈압의 높은 발병률과 연관되어져 있다. 또한 고혈압 우세는 하루에 최소 우유 1리터를 마시는 푸에르토리코 제도의 중년 남성들에 비해서 우유를 먹지 않는 푸에르토리코 제도의 중년남성들이 2배 높게 나타남이 보고되어졌다(2). 또한 미국인과 이탈리아인의 집단연구에서 우유소비는 고혈압을 정상혈압을 가진 사람들보다 낮추어줌을 보여주고 있다(3,4). 또한 유제품 소비는 뇌졸중 위험성과 연관되어있음을 보여준다. 22년간 남성 3,000명의 추적조사에서 우유의 소비는 혈전색전성 뇌졸중의 낮은 발병율과 관계되어져 있다(5). 85,000명의 미국여성들을 대상으로 한 간호원 건강 학문(Nurses' Health Study)(6)과 이번 연구에서 칼슘섭취와 뇌졸중의 역관계는 비 유제품 유래 칼슘보다 유제품 유래 칼슘이 더 큰 것을 알 수 있다. 그러므로 칼슘이외의 우유의 어느 성분들이 -예를들면, 다른 전해 단백질들 또는 펩티드들- 뇌졸중 발병과 관련해서 중요하다고 할 수 있다. 그러나, 우유소비와 고혈압과 뇌졸중의 발병과의 이로운 관계는 모든 연구에서 보여지지 않는다(7,8).

### 간섭적 연구

간섭적 연구는 혈압에서 우유와 유제품의 효과를 조사해 왔다. 최근 가장 괄목한 연구 중 하나는 대부분 정상혈압 또는 약간의 고혈압을 가진 500명의 피실험자로 실시한 고혈압을 막는 식이적 접근법(DASH, Dietary Approaches to Stop Hypertension)이다. 이는 과일, 야채, 저지방 유제품이 풍부한 규정식 (소위 맞춤 규정식)은 혈압을 상당히 낮추는 결과를 보여주고 있다. 총 연구 지원자들에게서 평균 심장 수축기 혈압과 평균 심장 확장기 혈압이 각각 5.5 mmHg와 3.0

mmHg씩 감소한다. 고혈압을 가진 피실험자들에게서 하락이 더 컸다. 평균 심장 수축기 혈압이 11.4 mmHg로 감소했고, 평균 심장 확장기 혈압이 5.5 mmHg씩 감소하였다. 혈압은 단지 과일과 야채가 풍부한 규정식보다는 맞춤 규정식에서 더 낮아진다(9,10). 뒤따른 연구(DASH II)에서는 나트륨 섭취가 하루 최대 1.5g으로 제한된 상태에서 평균 심장 수축기 혈압이 정상혈압 피실험자들에게서 7.1 mmHg씩 더 떨어졌다(11).

유제품의 소비가 혈압을 감소시킨다는 것은 몇몇의 다른 간섭적 연구에서도 보여주지만(12-15), 모든 연구에서 그 관계는 증명되어지지 않고 있다(16).

## 단백질과 혈압

우유는 전해질, 단백질, 펩티드 등을 포함하여 혈압에 이롭게 영향을 줄 수 있는 많은 성분을 포함한다. 우유는 80% 카제인과 20% 유장으로 구성된 단백질이 약 3.5% 함유되어 있다. 카제인은 알파 카제인, 베타 카제인, 카파 카제인으로 분류되어진다. 유장은 베타 락토글로불린, 알파 락토알부민과 몇몇의 소수 단백질들 - 효소, 미네랄 결합능, 이뮤노글로불린 같은 다른 생물학적 활동을 갖는다 - 을 포함한다(17).

몇몇 역학연구들은 단백질 섭취는 고혈압의 위험성과 역으로 관련된다고 제시한다(18-20). 두 가지 횡단 연구(호놀룰루 심장 프로그램 연구와 규정식 나트륨(Intersalt)에서는 단백질 섭취와 혈압 사이에 역관계를 보여준다(18,19). 또한, 단백질 섭취와 뇌졸중의 위험성과의 연관은 간호사 건강 연구(nurses' Health Study)에서도 보여진다. 그러나, 몇몇 역학적 연구에서는 높은 단백질 섭취와 혈압 사이에 역관계가 보여지지 않기도 한다(21).

또한 간섭적 연구에서는 혈압에 대한 식이 단백질의 효과가 연구되어졌다(22,23). 이러한 연구들의 몇몇 결과들은 높은 규정식 단백질 섭취는 고혈압의 낮은 발생율과 관련되어있음을 보인다. 그러나, 몇몇 간섭적 연구들은 혈압에서 단백질 섭취 수준에 따른 효과가 없음이 관찰되어진다(24).

단백질의 혈압강하 작용은 여전히 알려져 있지 않다. 한 가지 가능성은 단백질이 혈압강하 효과를 갖는 펩티드로 분해되는 것이다. 이번 논의에서 우리는 우유에서 유래된 펩티드의 혈압을 낮추는 효과에 관해서 집중 검토한다.

## 펩티드와 혈압

### 펩티드 생산과 흡수

우유 단백질이 소화효소 또는 우유의 발효동안에 락토바실러스에 의해서 생성된 단백분해효소에 의해 분해될 때, 생물학적으로 활성을 갖는 펩티드 조각들이 형성된다(24,25). 젖산 생성균은 단백질 분해 활성과 펩티드 생산의 능력을 가지고 있기 때문에 우유발효에 적당하다. 예를 들면 *L. helveticus* 균주를 포함하는 스타터는 생물활성 펩티드를 생산한다는 보고가 있다(26,27). 우유 펩티드 활성은 아편유사약물 수용체와 결합, 안지오텐신 전환효소(ACE) 억제, 항혈전성 조절, 면

역반응을 포함한다. 카제인으로부터 생성된 인펩티드(phospho-peptide)는 소화관에서 순환계로 미네랄, 특히 칼슘의 흡수를 향진시킨다(24).

단백분해과정에서 분해되지 않는 우유펩티드는 이론적으로 자체 그대로 흡수되어진다. 두 개 내지 세 개의 아미노산으로 이루어진 펩티드(Ile-Pro-Pro와 Val-Pro-Pro)들은 장에서 흡수된다고 알려져 있다. Val-Pro-Pro는 세포주위 확산을 거쳐 Caco2 세포 단층을 거쳐 수송된다고 보고되어지고 있다(29). 또한 좀더 긴 펩티드는 흡수도 연구되어지고 있다. 안지오텐신 전환효소(ACE) 억제 펩티드인 락토키닌(Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg)는 Caco-2 단층을 통해 자체 그대로 수송되어진다고 밝혀져 있다(30).

## 동물 연구

자발적 고혈압 쥐 모델(SHR)에서 Ile-Pro-Pro와 Val-Pro-Pro는 단일 구강투여 후 혈압의 감소가 보여진다(27). 또한, 구강투여 12내지 13주 정도의 오랜 기간후에도 펩티드들은 자발적 고혈압 쥐 모델에서의 고혈압으로 진행을 저해했다. 12주의 투여기간 마지막 시점에서 심장 수축기 혈압은 물을 받은 대조군보다 Ile-Pro-Pro와 Val-Pro-Pro가 포함된 *L. helveticus* LBK-16H 균주가 발효 우유를 받은 실험군이 17mmHg가 더 낮았고( $p<0.001$ ), 대조군보다 상기 펩티드가 들어 있는 물을 받은 실험군이 12mmHg가 더 낮았다(31). 13주째 실험에서는 Ile-Pro-Pro와 Val-Pro-Pro 펩티드가 포함된 *L. helveticus* LBK-16H 발효 우유가 물( $p<0.001$ ) 또는 LBK-16H 발효 우유( $p<0.001$ )의 펩티드 양의 반을 포함한 *L. helveticus*와 *S. cerevisia* 보다 더 효율적으로 고혈압의 진행을 감소시켰다(32). 자발적 고혈압쥐(SHR)와 정상혈압 Wistar-Kyoto쥐(WKY)에서 알파 락토크린(Tyr-Gly-Leu-Phe)이 복용량 비례적으로 혈압을 감소시키는 것을 보여주었다. 혈압은 연속적 방사성원격측정 모니터링으로 측정했고, 심장 수축기와 심장확장기 혈압에서의 최대 감소는 각각  $23\pm 4$ 와  $17\pm 4$  mmHg였다(33). 발효유에서 두 개의 *L. helveticus* 균주인 *L. helveticus* CHCC637과 *L. helveticus* CHCC641는 안지오텐신 전환효소(ACE) 억제 효과를 가진다. 이 발효 우유는 자발적 혈압쥐에서 대조군보다 더 혈압을 감소시켰다(34).

## 임상 연구

또한 Ile-Pro-Pro와 Val-Pro-Pro 펩티드가 포함된 *Lactobacillus helveticus* 발효 우유는 고혈압을 가진 피실험자에서 심장 수축기와 심장 확장기 혈압을 감소시키는 것으로 보여지고 있다(35-38). 고혈압을 가진 피실험자에 대한 위약(placebo) 제어 실험에서 *L. helveticus*와 *S. cerevisiae* 발효 우유는 8주 간섭 동안에 위약 발효 우유보다 심장수축기와 심장확장기 혈압( $p<0.05$ )을 더 감소시켰다(35). 17명의 고혈압을 가진 피실험자에 대한 8주간 위약 제어 연구에서 심장 수축기와 심장 확장기 혈압은 *Lactococcus* sp. 혼합배양하여 발효된 일반 발효 우유를 받은 대조군( $p=0.05$ 와  $p<0.05$ )보다 Ile-Pro-Pro와 Val-Pro-Pro 펩티드가 포함된 *L. helveticus* 발효 우유를 받은 실험군이 낮았고(37), 또한 장기 임상 연구(21주)에서 심장 수축기와 심장 확장기 혈압은 발효된 우유( $n=17$ ) 대조군보다 *L. helveticus* 발효 우유 실험군( $n=22$ )이 더 많이 감소

되었다(SBP  $6.7 \pm 3.0$ ,  $p=0.030$  그리고 DBP  $3.6 \pm 1.9$ ,  $p=0.059$ )(36). Ile-Pro-Pro와 Val-Pro-Pro 펩티드가 포함된 정제들은 어느 정도 적은 고혈압을 가진 피실험자들에게 혈압을 낮추어주는 것을 보여주고 있다(39). 감마아미노뷰티릭산(GABA)이 포함된 *Lb. case*와 *Lc. Lactis*를 사용하여 발효시킨 우유는 12주 처리기간동안 혈압을 감소시켰다. 심장 수축기 혈압은 대조군( $p<0.05$ ) 보다 발효 우유 실험군에서 많이 낮았으나, 발효 우유 실험군의 심장 확장기 혈압은 대조군과 차이가 없었다(40). 또다른 8주간 실험에서 *Streptococcus thermophilus* 2종과 *Lactobacillus rhamnosus* 1종을 발효시킨 요거트를 받은 대조군에 비해서 *Enterococcus faecium* 1종과 *Streptococcus thermophilus* 2종을 발효시킨 요거트를 받은 실험군과 *Streptococcus thermophilus* 2종과 *Lactobacillus acidophilus* 2종을 발효시킨 요거트를 받은 실험군에서 심장 수축기 혈압은 현저하게 낮아졌다(41).

## 우유 펩티드(milk peptide)의 혈압강하 효과(antihypertensive effect) 작용기전

### 안지오텐신 전환 효소 억제

우유에서 유래된 펩티드가 혈압을 낮추는 작용기전은 안지오텐신 전환효소(26, 27, 32, 33, 42-45)를 억제 하는 것이다. 이 작용기전은 고혈압 저해 효과와 관련하여 연구되어 왔다. 안지오텐신 전환효소(ACE)는 renin-angiotensin system (RAS)의 기능에 중요한 역할을 하는 효소이며, RAS는 혈압의 조절과 체액과 전해질의 균형에 중요한 역할을 한다(46). RAS에서의 안지오텐신 I은 안지오텐신 전환효소에 의해서 안지오텐신 II로 전환된다. 안지오텐신 II는 알도스테론(aldoosterone)의 방출을 유도하는 효과적인 혈관수축제이며, 나트륨의 농도를 증가시키고 나아가 혈압을 높이는 역할을 한다. 안지오텐신 전환효소 억제제는 RAS에 두 가지 영향을 주는데, 그들은 안지오텐신 II의 생산량을 줄이고 안지오텐신 전환효소와 같은 효소인 Kininase II에 의한 혈관확장제 bradykinin의 분해를 막는다.

유제품에서 분리된 몇몇 고혈압 저해 펩티드는 안지오텐신 전환효소를 억제하는 작용을 하며 이들의 억제 활성이 측정되었다. IC<sub>50</sub> 값은 안지오텐신 전환효소의 활성을 실험상에서 50%로 저해 할 수 있는 농도를 말한다. 안지오텐신 전환효소 저해 펩티드와 화학적 구조에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없지만, 펩티드의 C-terminal 위치의 소수성 아미노산이 안지오텐신의 저해제로 쓰인다고 추측되고 있다 (47).

*L. helveticus* proteases에 분해된 카제인 유래 펩티드는 안지오텐신 전환효소 저해 활성을 가진 것으로 보인다 (48). 카제인에서 유래된 3개의 아미노산으로 구성된 펩티드 Ile-Pro-Pro와 Val-Pro-Pro의 안지오텐신 전환효소 저해 활성이 실험상에서 관찰되었다 (26). *L. helveticus*는 우유에 포함되어 있는 Ile-Pro-Pro와 Val-Pro-Pro를 발효시키고, 장시간 처리하면 자발적 고혈압 쥐 모델의 혈장 renin 활성을 높여준다 (32). 또한 자발적 고혈압 쥐 모델의 대동맥에서의 안지오텐신 전환효소의 활성은 *L. helveticus*와 *S. cerevisiae*를 장시간 처리하여 우유에 함유된 Ile-Pro-Pro와 Val-Pro-Pro를 발효시키고 난 후 감소한다. (28, 49). 안지오텐신 전환효소 저해 할



성이 적은 고혈압 저해 펩티드 역시 유제품에서 분리되었다 (33, 43, 45). 따라서 우유의 펩티드들은 안지오텐신 전환효소 저해 이외에도 혈압에 다른 영향을 미치는 것으로 보인다.

## 이외의 가능한 작용기전

몇몇 우유 펩티드는 아편유사약물과 비슷한 역할을 한다. 전형적인 아편유사약물 펩티드는 세 가지 전구체, pro-opiomelanocortin (endorphins), pre-enkephalin (enkephalins)와 prodynorphin (dynorphins)에서 유래된다. 세 가지 모두 N-말단기 아미노산 서열이 Tyr-Gly-Gly-Phe로 동일하다 (25). 아편유사약물들은 아편수용체와 결합하여 모르핀과 같은 작용을 한다. 아편유사약물 체계는 여러가지 다른 내인성 아편유사 펩티드들과 그 수용체들이 있다. 아편유사약물들은 중추 신경계와 말초조직에 존재하여, 순환계의 조절에 영향을 미치기도 한다 (50). 아편유사약물들은 또한 혈압에도 영향을 미친다 (51). 카제인의 많은 펩티드 조각들이 아편유사약물과 같은 활성이 있는 것으로 밝혀졌으며 처음으로 규명된 아편유사성 우유 펩티드( $\beta$ -casomorphin)는 베타카제인으로 부터 유래되었다. 알파카제인에서 유래된 아편유사성 펩티드는  $\alpha$ -exorphins이라 불리며 카파카제인에서 유도된 것은 casoxins이라 부른다. 또한 아편유사약물 펩티드는 유장 단백질 알파락토알부민과 베타락토글로불린들로부터 유래될 수 있다. 알파락토알부민에서 찾아낸  $\alpha$ -Lactorphin은 자발적 고혈압 쥐 모델에서 혈압을 낮추는 것으로 관찰되었다.  $\alpha$ -lactorphin의 혈압강하 효과는 아편유사약물 수용체, naloxone 길항제에 의해 완전히 저해되기 때문에 혈압강하 효과는 아편유사물질 수용체를 통하여 전달된다 (33).

카제인-인펩티드와 같은 펩티드는 칼슘의 용해도를 높여 칼슘의 흡수도를 높이는 역할을 하는 것으로 보고되었으며 (52, 53), 어떤 우유 펩티드는 ADP-활성화 혈소판의 응집을 저해하는 등의 항혈전 효과를 가지고 있다 (54). 이것은 우유 펩티드가 심혈관에 유용한 역할을 하는 것으로 볼 수 있다.

## 참 고 문 헌

1. Sipola M. Effects of milk products and milk protein-derived peptides on blood pressure and arterial function in rats. Doctoral Thesis supervised by Docent Riitta Korpela, PhD, Institute of Biomedicine, Pharmacology, University of Helsinki, Finland.
2. The list of other references can be obtained from Dr. R. Korpela.

## II. 뼈의 무기물 침착 (Bone mineralization)

### 유단백과 뼈

#### 우유의 소비와 뼈와의 상호관계

우유는 단백질, 칼슘, 인, 마그네슘, 칼륨과 아연 같은 뼈의 건강에 중요한 역할을 하는 몇몇 영양분의 훌륭한 원천이다. 유년기와 청소년기의 우유 소비에 대한 역학적 연구는 성인의 뼈 무기물 밀도(bone mineral density)와 연관이 있다(Sandler et al. 1865, Hirota et al. 1992, Stracke et al. 1983, Murphy et al. 1994, Soroko et al. 1994, Teegarden et al. 1995, New et al. 1997, Kalkwarf et al. 2003). 이러한 효과는 특히 백인 여성에서 확립되어 왔다(Optowsky and Bilezikian 2003). 우유 섭취의 횡단면적 연구는 어린이(Black et al. 2002), 성인 남성(Egami et al. 2003), 그리고 여성(Lacey et al. 1991, Tylavsky et al. 1992, Davis et al. 1996, Hawker et al. 2002)의 뼈 무기물 밀도와 상호관련이 있는 것으로 보인다.

우유와 유제품이 청소년기의 소녀(Chan et al. 1995, Cadogan et al. 1997, Merrilees et al. 2000)와 소년에서(Renner et al. 1998) 모두, 뼈 무기물 밀도를 높인다. 폐경 이전과 이후의 여성에게서, 우유와 유제품을 전혀 섭취하지 않아 뼈 무기물 밀도가 높아지지 않은 대조군에 비해 2~4년 동안 유제품을 섭취 해온 여성들이 골질의 손실이 적다는 연구 결과가 있다(Baran et al. 1990, Chee et al. 2003). 이 연구의 대조군은 충분한 칼슘의 섭취가 이루어지지 않았고, 따라서 그 결과 유제품을 섭취한 그룹이 칼슘 섭취도 높은 것으로 나타났다. 칼슘섭취량이 규제된 실험에서도, 유제품의 섭취를 통한 칼슘의 보충은 청소년기 뼈의 무기물 밀도를 높이며(Matkovic et al. 2004) 폐경기 여성에서의 골질 손실을 줄일 수 있다(Prince et al. 1995). 유제품은 뼈의 무기물 밀도뿐만 아니라 뼈의 성장에도 도움을 주는 것으로 보인다(Matkovic et al. 2004).

우유와 유제품의 골절 위험도에 대한 영향은 어린이와 여성에 대해서 연구되어 왔다. 최근에는 우유 섭취가 적은 아이들이 사춘기 이전의 골절에 높은 위험성을 보인다는 결과가 있었다(Gouding et al. 2004). 일본의 한 실험에서는 12~14년 동안 높은 우유 소비를 보였던 여성들은 골절의 위험이 적은 것으로 나타났다(Fujiwara et al. 2003). 북미에서 진행된 실험에서는 유년기의 우유 섭취가 50세 이후의 여성의 골절 위험도를 낮춘다는 보고가 있었지만(Kalkwarf et al. 2003), 성인의 우유 섭취는 골절 위험도와 관련이 없는 것으로 보인다(Feskanich et al. 1997, 2003).

이러한 결과들은 우유와 유제품의 소비가 성장기 동안의 뼈 무기물 밀도를 높이는 것과 노화와 관련된 골질의 손실을 막는다는 사실을 말해준다. 이것은 북미에서는 칼슘 섭취의 80%를 유제품에서 얻는다는 것을 고려해 볼 때, 높은 칼슘의 섭취에 의한 결과일지도 모른다(Fleming and Heimbach 1994). 그러나 뼈에 영향을 미치는 우유의 다른 성분들이 있다.

## 단백질 섭취와 뼈

단백질의 섭취는 뼈의 건강에 중요한 역할을 한다. 결핍과 과잉섭취 모두 뼈에 유해한 영향을 미친다 (for reviews see Dawson-Hughes 2003, Ginty 2003). 뼈에 대한 단백질의 영향은 칼슘의 섭취에 좌우된다 (Meyer et al. 1997). 단백질의 섭취 증가는 산의 증가를 통한 칼슘 배출의 원인이 되나 이는 칼슘 흡수가 충분할 때는 큰 영향을 미치지 않는다 (Heaney 1998, Dawson-Hughes and Harris 2002, Dawson-Hughes et al. 2004). 또 단백질의 칼슘에 대한 영향은 뼈의 성장과 무기물 밀도를 조절하는 (Yakar et al. 2002) insulin-like growth factor 1 (IGF-1)을 통해서도 이루어진다 (for review see Bonjour et al. 1997). 단백질의 공급은 장액 IGF 레벨을 높이고 (Schürch et al. 1998) 단백질의 제한은 IGF 레벨을 떨어뜨린다 (Bourrin et al. 2000). 우유의 섭취와 높은 IGF-1 레벨의 연관성은 단백질의 영향인 것으로 보인다 (Cadogan et al. 1997, Heaney et al. 1999).

단백질의 섭취는 성인의 뼈 무기물 밀도와 관련이 있다 (Promislow et al. 2002), 이것은 폐경기 여성의 뼈 무기물 밀도와도 관련이 있다 (Kerstetter et al. 2000) (Hannan et al. 2000, for review see Bell and Whiting 2002). 골절 위험도에 대한 단백질의 영향은 전환적이다 (negative: Feskanich et al. 1996, Sellmeyer et al. 2001, positive: Munger et al. 1999).

## 유장 단백질과 뼈

우유의 3%는 단백질이며, 이것의 80%는 카제인, 20%는 유장 단백질이다. 알파락토알부민과 베타락토글로블린과 같은 유장단백질은 칼슘과 결합한다. 그러나 인체 내에서 칼슘의 균형뿐만 아니라 유지에도 영향을 미치는 것은 아니다 (Takada et al. 1997a, for review see Gueguen and Pointillart 2000). 사실, 유장 단백질은 카제인과 비교하여 대퇴골의 총 아미노산 함량을 증가시켜 쥐의 골절 에너지 (bone-breaking energy)를 높이는 것으로 관찰되었다 (Takada et al. 1997a). 7주간의 실험에서는 성장기에 있는 쥐에 유장단백질을 공급하여주면 대퇴골의 밀도 혹은 뼈의 기전에 대한 다른 생물학적 표지에는 영향을 미치지 않는다 (Kelly et al. 2003). 그러나, 유장 단백질을 공급하는 카제인 식이에 의해서는 이소성 골 형성 모델이 14주 후에 뼈 형성이 증가되었음을 볼 수 있었다 (Kelly et al. 2003). 이는 실험기간이 유장 단백질이 뼈에 미치는 영향을 측정하기에는 너무 짧았음을 의미한다. 이러한 결과는 유장단백질이 무기물의 생물학적 유용도를 높이는 것이 아니라 뼈 단백질 - 특히 콜라겐 성분 - 을 제공하는 것을 말한다.

유장 단백질은 파골세포의 성장과 활성을 감소시킨다 (Takada et al. 1997b). 파골세포의 형성은 다핵 세포의 형성으로 측정하며 이것은 최고 1mg/ml의 유장에 의해 감소된다. 유장 단백질은 또한 조골세포를 활성화시킨다 (Takada et al. 1996).

뼈에 대한 유장단백질의 영향은 단백질의 염기성부분에서 올 수 있다 (염기성 유단백질). 추출된 염기성 유단백질은 난소 절제된 쥐의 뼈의 약화를 줄여준다 (Kato et al. 2000). 임상실험에서는 단기간 염기성 유단백질을 섭취함으로써 요골과 종골 골밀도를 높이고 뼈의 음식 작용 지표를 감소시키는 결과를 얻었다 (Aoe et al. 2001, Toba et al. 2001, Yamamura et al. 2002). 염기

성 유단백질의 활성 성분은 높은 운동성 그룹 단백질 (high-mobility-group-like proteins) 중 하나인 kininogen으로 밝혀졌다 (Yamamura et al. 1999, 2000). 이 활성물질의 작용기전 중 하나는 콜라겐-소화 카텝신 분비를 감소시켜 파골세포 활성을 저해하는 작용을 가진 cystatin C를 이용하여 뼈에 영향을 주는 것이다 (Matsuoka et al. 2002).

뼈에 대한 우유의 영향을 종합해보면, 우유의 소비는 뼈 무기질 함량에 긍정적인 영향을 미치며 또한 우유 단백질은 충분한 칼슘의 공급으로 뼈 건강에 유익한 영향을 미친다.

## 칼슘과 뼈의 대사작용에서의 우유 유래 생물 활성 펩티드

위장에서 음식단백질들은 작은 펩티드로 소화된다. 이 소화된 펩티드 중에 몇 가지는 생리학적 활성을 갖는다 (Korhonen and Pihlanto 2003). 생물체에 작용하는 펩티드는 소화효소에 의해 가수분해 되어 형성되거나 스타터 배양을 통해 발효되는 동안 형성될 수 있다 (Korhonen and Pihlanto 2003). 발효과정 동안 형성되는 펩티드는 사용되는 박테리아에 따라 달라진다 (Matar et al. 1996). 활성이 있는 펩티드는 3개~20개 정도의 아미노산 잔기로 이루어져 있다. 생물체에 작용하는 펩티드는 우유, 계란, 콩, 생선 그리고 옥수수과 같은 음식에서 찾았다 (Kitts and Weiler 2003). 하지만 생물체에 작용하는 펩티드의 중요한 원천은 우유 단백질이다 (Korhonen and Pihlanto 2003).

이런 펩티드가 생물체에 작용하기 위해서는 위장에서 소화가 되면 안 된다. 작은 펩티드의 흡수작용은 잘 알려져 있다 (Fricker and Drewe 1996). 펩티드는 enterocytosis, 특히 cytotosis나 운반자 등을 통해 수동확산되어 위장계통 소화기관의 벽으로 흡수될 수 있다 (Fricker and Drewe 1996). 하지만 CPP (caseinphosphopeptides)와 같은 펩티드는 위장계통 소화기관에서 흡수되지 않고 그들의 활성을 나타낸다.

생물체에 작용하는 펩티드는 *in vitro*와 *in vivo*에서 여러 가지 생리학적 활성을 보여준다 (Pihlanto-Leppala 1999, Korhonen and Pihlanto 2003, Maisel and Fitzgerald 2003). 카제인 단백질이나 유장단백질에서 얻은 아편유사 펩티드는 마취제와 똑같은 효과를 보일 뿐만 아니라 마취제 수용체에 대한 친화력도 가지고 있다. 그들은 아편유사약물 수용체에 대해 촉진제 또는 길항제로 작용한다. 아편유사 펩티드는 신경체계, 위장 통과 시간, 영양분 흡수 그리고 인슐린과 글루카곤의 분비에 영향을 준다. 카제인 단백질에서 유도된 항혈전 펩티드는 혈소판의 응집을 저해한다. 면역조절 펩티드는 대식세포의 식세포능과 사람의 림프구의 성장을 촉진시킨다. 미생물의 필수영양분이 철과 결합하는 능력이 있는 작은 유장단백질은 항균활성을 가지고 있다 (Clare et al. 2003). 카제인 단백질에서 유도된 펩티드는 항균활성 뿐만 아니라 항우식성 활성도 가지고 있다 (Aimutis 2004). 최근 발표에 의하면 생물학적 활성을 가진 펩티드는 항산화 활성과 저콜레스테롤 효과도 가지고 있다. 하나의 생물학적 활성을 가지는 펩티드는 여러 가지 생리학적 효과를 나타낸다. 예를 들어 카제인 단백질에서 유도된 beta-casomorphin 7은 안지오텐신 전환효소 (ACE) 억제효과와 아편유사약물과 같은 효과를 나타낸다 (Maisel and Bockelmann 1999). 칼슘 대사작용에서 연구된 것은 우유단백질에서 유도된 CPP 뿐이다.

## Caseinphosphopeptide (CPP)

CPP는 보통 인간기를 가진 펩티드이다. 인펩티드는 발효과정 동안이나 위장에서 단백질을 분해 효소에 의해 카제인 단백질로부터 형성된다. CPP는 칼슘과 함께 소수성 복합체를 형성하여 칼슘의 흡수를 증가시킨다. 이런 식으로 물에 녹지 않는 calcium phosphate의 형성을 저해한다 (Meisel and Bockelmann 1999). 장에서 칼슘의 침전을 저해함으로써 칼슘의 흡수를 증가시키는 CPP 효과가 *In vitro* 연구되었다 (Sato et al. 1986). CPP의 이러한 효과는 동물실험에서 재확인되었다. 대부분의 연구에서 CPP는 칼슘의 흡수를 증가시킨다 (Mykkanen and Wasserman 1980, Lee et al. 1980, 1983, Kitts et al. 1992, Kirayama et al. 1992, Tsuchita et al. 1993, 2001, Bennett et al. 2000). 하지만 몇몇 연구에서는 칼슘 흡수에 대해 CPP 효과를 보여주지 못했다 (Brommage et al. 1991, Kopra et al. 1992). 뼈에서 단지 하나의 연구만이 CPP의 효과에 대해 연구를 했다. 이 연구에서 난소절제 쥐에서 뼈의 손실을 예방한다고 발표했다 (Tsuchita et al. 1996).

1950년 초에 Mellander는 구루병에 걸린 아이들을 연구하여 사람에게 대한 CPP의 효과를 처음으로 밝혀냈다 (Mellander 1950). 칼슘 흡수의 증가가 비타민 D에 독립적이라는 사실은 CPP에 의한 칼슘 흡수의 증가는 말단 소장에서 일어난다는 것을 암시한다. 이러한 CPP의 효과는 물질의 칼슘상태와 칼슘 흡수에 영향을 주는 다른 영양물질에 영향을 받는다는 것이 임상실험에서 밝혀졌다 (Heaney et al. 1994, Hansen et al. 1997a, 1997b). 칼슘 흡수율이 낮은 여성에게 CPP를 처방한 결과 칼슘 흡수가 증가하였다 (Heaney et al. 1994). 하지만 다른 음식에 CPP를 1-2g을 혼식한 결과 칼슘 흡수에 대한 앞의 결과와 상반되는 결과를 나타냈다. 칼슘은 유장단백질로부터 섭취하는 것보다 췌에서 섭취하였을 때 더욱 효과적인 흡수를 나타냈다 (Hansen et al. 1997a); 그러나 후에 연구된 결과에 의하면 CPP에 의한 칼슘 흡수효과는 phytate가 함유된 음식에 영향을 받지 않는 것으로 밝혀졌다 (Hansen et al. 1997b).

결론적으로 CPP는 동물연구에서는 칼슘 흡수를 증가시켰지만 임상실험 결과는 확정적이지 못하다.

## *Lactobacillus helveticus* 발효유

발효과정 동안 생리적 활성을 가진 생물체에 작용하는 펩티드가 형성된다. 이 펩티드는 무기물의 흡수를 증가시킨다. 그럼에도 불구하고 생물체에 작용하는 펩티드와 뼈와의 관계에 대해 연구된 결과는 없다. 우리 연구의 목표는 *in vivo*에서 쥐를, *in vitro*에서는 조골세포와 파골세포의 전구세포를 이용하여 인펩티드의 뼈의 대사작용의 연구를 통해 *Lactobacillus helveticus*에 의해 발효된 우유의 효과를 확인하는 것이다.

연구의 결과를 나열해 보면 다음과 같다.

1. *L. helveticus*에 의해 발효된 우유는 성장기의 쥐에서는 뼈의 무기물 밀도를 유지하고, 난소절제 쥐에서는 뼈의 손실을 줄인다. *L. helveticus*에 의해 발효된 우유의 효과는 발효과정 동안

형성된 isoleucyl-prolyl-proline(IPP)와 valyl-prolyl-proline(VPP) 펩티드에 의해 나타내는 것 같다.

2. IPP와 VPP 펩티드는 조골 전구세포에서 뼈의 형성을 증가시켰다. 하지만, IPP와 VPP 펩티드를 물에 녹여 동물모델에 투여한 결과 뼈의 대사작용에 아무런 효과를 나타내지 않았다.
3. *L. helveticus*에 의해 발효된 우유는 폐경 후의 여성의 칼슘 흡수를 증가시켰지만, rat의 뼈 칼슘량을 분석해 본 결과 칼슘의 생물학적 이용도는 증가하지 않았다.

요약하면, *L. helveticus*에 의해 발효된 우유는 칼슘 흡수를 증가시키고 뼈의 무기물 밀도를 유지한다. 이 연구에서 *L. helveticus*에 의해 발효된 우유는 나이를 먹는 동안 뼈의 질량을 높게 유지시키고 뼈의 손실을 저해하는 건강식품으로서 가치가 있다고 제시하고 있다.

## 참 고 문 헌

1. Narva M. Effects of *Lactobacillus helveticus* fermented milk and milk-derived bioactive peptides (CPP, IPP and VPP) on calcium and bone metabolism. Doctoral Thesis supervised by Docent Riitta Korpela, PhD, Institute of Biomedicine, Pharmacology, University of Helsinki, Finland.
2. 다른 참고문헌은 Dr. Riitta korpela 논문을 참고하십시오