

## 오메가-3 지방산 함유 복분자종자유에 의한 고지방식이 유도 고지혈증 마우스의 혈중 중성지방 및 콜레스테롤 감소 효과

전혜린<sup>1</sup> · 오수진<sup>2</sup> · 남현수<sup>2</sup> · 송운석<sup>3</sup> · 최경철<sup>1</sup>

<sup>1</sup>울산대학교의과대학

<sup>2</sup>(주)제이크린베리너리

<sup>3</sup>(재)전북생물산업진흥원

### Reduction of Plasma Triglycerides and Cholesterol in High Fat Diet-Induced Hyper-Lipidemic Mice by n-3 Fatty Acid from Bokbunja (*Rubus coreanus* Miquel) Seed Oil

Hyelin Jeon<sup>1</sup>, Su-Jin Oh<sup>2</sup>, Hyun Soo Nam<sup>2</sup>, Yoon Seok Song<sup>3</sup>, and Kyung-Chul Choi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Sciences, University of Ulsan College of Medicine

<sup>2</sup>JKberrynary

<sup>3</sup>Jeonbuk Institute for Bioindustry

**ABSTRACT** To investigate the effect of n-3 fatty acid from Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) seed oil (BSO), we examined improvement of plasma triglycerides and cholesterol *in vivo*. Five-week-old ICR mice were divided into five groups of six mice each; Control, high fat diet (HFD) control (negative control), salmon oil control (positive control, HFD+commercial n-3 fatty acid), and BSO experimental groups (HFD+1 g/60 kg BW/d, HFD+2 g/60 kg BW/d). After 4 weeks of BSO treatment, we measured serum triglyceride and cholesterol levels. The levels of low-density lipoprotein/very-low-density lipoprotein-cholesterol, high-density lipoprotein-cholesterol, and total cholesterol were significantly ( $P<0.05$ ) reduced in the group fed BSO at 2 g/60 kg BW/d compared to the negative control. Levels of triglycerides, which are similar to cholesterol, were also significantly ( $P<0.05$ ) reduced in the same group. To investigate further, we tested blood coagulation parameters. Prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) were not significantly different among the five groups according to BSO. However, the 2 g/60 kg BW/d BSO group treated with PT and aPTT showed a tendency to live longer than the negative control. Taken together, BSO might improve blood homeostasis mediated via hypo-lipidemic and anti-coagulation activities.

**Key words:** Bokbunja seed oil, *Rubus coreanus*, hyper-lipidemia, blood flow improvement, omega-3

## 서 론

최근 식생활의 서구화와 더불어 생활의 편리화로 인해 섭취하는 영양은 과다한 반면, 운동량은 적어져 대사성질환과 같은 선진국형 질병이 증가하고 있다(1-3). 2013년 우리나라 사망원인통계에서 순환기계통질환 원인 사망자 수는 57,182명으로 21.5%를 차지했다(4). 순환기계통질환에 포함되는 동맥경화증을 일으키는 주요 원인으로는 고지혈증이 있는데(5,6), 이는 총콜레스테롤, 중성지방 등 혈액 내 지질의 농도가 비정상적으로 높은 상태를 말하며, 이러한 고지혈증에 의해서 혈액순환에 장애가 생길 수 있다(6-8).

이러한 대사성질환은 치료보다 예방이 중요한 질환으로 여겨져 이를 위한 식이조절 및 식품의 기능성 탐구가 강조되고 있다.

그중에서도 오메가-3 지방산은 식품을 통해 공급받을 수 있는 필수지방산으로 eicosapentaenoic acid(EPA), docosahexaenoic acid(DHA)를 포함한다. EPA와 DHA의 전구체인  $\alpha$ -linolenic acid(리놀렌산)를 섭취할 경우 체내에서 EPA와 DHA가 합성되기는 하지만 전환되는 효율이 낮기 때문에 EPA와 DHA가 풍부한 식품을 섭취하는 것이 더 좋다고 알려져 있다(9-11). 여러 연구들에 의하면 오메가-3 지방산 등이 고지혈증 환자의 혈중 지방감소(12,13), 혈전생성억제(14,15), 죽상동맥경화를 유발시킬 수 있는 플라크 생성억제(16,17), 혈관내피세포의 이완촉진(18,19) 등을 통해 혈액순환 개선에 도움을 주는 것으로 알려져 있다(20).

오포자(烏蘆子), 대맥매(大麥莓), 삽전표(挿田蘂), 재양표(栽秧蘂)라고도 불리는 복분자는 장미과(Rosaceae)에 속하

Received 25 March 2015; Accepted 10 April 2015

Corresponding author: Kyung-Chul Choi, Department of Biomedical Sciences, University of Ulsan College of Medicine, Seoul 138-736, Korea

E-mail: choikc75@amc.seoul.kr, Phone: +82-2-3010-2087

는 낙엽관목으로 학명은 *Rubus coreanus* Miquel이며, 우리나라 중부 이남의 산기슭 양지에서 자라는 식물로 흰 분으로 덮인 줄기와 갈고리 모양의 가시가 특징이고 높이는 2~3 m 정도이다. 5~6월에 꽃이 피고 7~8월에 열매가 성숙되어 둥글고 붉은색으로 익다가 나중에 흑색으로 완숙된다(21,22). 우리나라에서 복분자(覆盆子)라는 명칭은 한약재로 사용되는 장미과 식물의 '복분자 딸기'와 '산딸기나무 딸기'의 미성숙 종자를 말린 것을 총칭하는데, 「동의보감」에 따르면 한방에서 강장(强壯), 강정(强精), 명목(明目), 이뇨제의 효능이 있고, 빈뇨(頻尿)를 치료한다고 하여 약용으로 널리 쓰여 왔다.

우리나라에서 자생하는 복분자(*Rubus coreanus* Miq.)는 열매의 성숙도에 따라 생리활성도가 달라지고(23), 열매, 잎, 줄기 부위에도 생리활성 효과가가 다르게 나타난다고 알려져 있다(24). 특히 열매의 생리활성 성분으로는 안토시아닌과 다양한 폴리페놀 등이 보고되어 있다(25-27). 또한 그에 대한 생리활성 연구는 항암(21,28), 항산화(28-30), 면역(28,31,32), 골다공증(33), 항스트레스 및 콜레스테롤과 혈압개선(24), 기억력감퇴 개선(27) 등에서 이루어졌다. 그러나 대부분의 연구는 복분자 열매의 과즙이나 잎, 열매 추출물을 이용한 것이며, 복분자종자유를 이용한 연구는 미비한 실정이다. 복분자 열매의 과즙을 착즙하고 남은 복분자 슬러지를 이용해 착유과정을 거쳐 생산되는 복분자종자유는 식물성 오일로 리놀레산(1.11 mg/g), 폴리페놀(0.68 mg/g), 플라보노이드(1.13 mg/g) 그리고 비타민 E(8.30 mg α-TE/100g)를 함유한다. 또한 오메가-3 지방산인 리놀렌산과 오메가-6 지방산인 리놀레산이 풍부하고 감마리놀렌산을 포함하는 것이 특징이며, 이를 통한 혈중 중성지방과 콜레스테롤 수치의 개선이 가능할 것이라 예상하였다. 이뿐만 아니라 이러한 성분들은 대표적인 성인병인 비만, 당뇨 질환 개선에도 영향을 줄 것으로 예상되었다. 따라서 주스를 만들고 버려지는 복분자에서 분리된 씨로부터 얻을 수 있는 복분자종자유를 이용하여 콜레스테롤 및 중성지방 감소에 대한 기능성을 확인하고 이를 이용한 다양한 활용 방안을 모색하고자 연구를 수행하게 되었다.

## 재료 및 방법

### 복분자종자유의 공급

복분자종자유(Bokbunja seed oil; BSO)는 (주)제이크린 베리너리(Seoul, Korea)에서 공급받아 사용하였다. 복분자종자유는 특허기술(특허등록번호: 10-1168169-0000)을 이용해 착유한 것이며, 간단히 서술하자면 다음과 같다. 복분자 열매는 1차 착즙을 거쳐 과즙을 얻은 뒤 그 잔사를 압착기에 넣고 농축액을 얻는 2차 착즙과정을 거친다. 2차 착즙까지 거친 복분자 열매의 잔사는 체-진동기기에서 분리한 후 원심분리기(ADS-1003CS, Hanil SME, Anyang, Korea)로 2,000~5,000 rpm, 10~30분간 씨만을 재분리하여 오일

리브형(OIL LOVE, Dasan FoodMachine, Siheung, Korea) 또는 익스펠라형(D-1680, Dasan FoodMachine) 착유기를 사용하여 80~150℃에서 5~40분간 압착, 착유하여 얻는다.

### 지방산 조성 및 잔류농약 검사

식품의약품안전처로부터 식품위생검사 기관으로 지정된 한국기능식품연구원(Seongnam, Korea)에 의뢰하여 복분자종자유의 지방산 분석 및 폴리페놀과 플라보노이드 분석, 그리고 잔류농약, 곰팡이 독소, 세균 수 및 대장균 수 검사를 실시했다.

### 동물사육

본 실험에서 사용된 고지혈증 모델은 ICR 마우스에 고지방식을 제공하여 고지혈증을 유도하는 모델로 5주령의 암컷과 수컷 마우스(25±2 g)를 (주)중앙실험동물(Seoul, Korea)로부터 공급받아 일주일 동안 안정기를 가진 뒤, 45% fat 함량을 가지는 식이((주)중앙실험동물) 일정량과 식수를 충분히 공급하고 항온(25±2℃), 항습(50±5%), dark/light 12시간의 조건을 유지하였다. 총 4주간의 실험기간 동안 실험동물에게 주어지는 복분자종자유는 각 군별로 경구 투여되었고, 양성대조군은 시판되는 연어유(오메가-3 지방산)가 경구 투여되었다. 이 실험은 서울아산병원 아산생명과학연구원 실험동물연구실에서 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: 2014-12-025)을 받아 진행되었으며, 실험기간 동안 연구 지침을 준수하였다.

실험군은 마우스 6마리를 한 군으로 하여 정상대조군(Normal control), 음성대조군(Negative control, 고지혈증 유도군, high fat diet; HFD), 양성대조군(Positive control, 고지혈증 유도 및 오메가-3 제공군, commercial n-3 fatty acid), 복분자종자유 급이군(고지혈증 유도 및 BSO 제공군, 1 g/60 kg BW/d(BSO 1 g), 2 g/60 kg BW/d(BSO 2 g))으로 하였고 마우스는 난괴법을 이용, 무작위로 배정되었다.

정상대조군은 기본사료(normal chow)를 자율급식으로 제공하며 실험군과 같은 스트레스 강도를 주기 위해 경구 투여를 실시하였는데, 이때 투여물질은 0.5% carboxymethyl cellulose(CMC) 용액으로 하였으며 연어유 및 복분자종자유 급이군과 같은 부피를 주입하였다. 음성대조군은 45% fat을 함유하는 고지방식을 자율급식으로 제공하며 마찬가지로 0.5% CMC 용액을 경구 투여하였다. 양성대조군은 45% fat을 함유하는 고지방식을 자율급식으로 제공하며 시판되는 연어유(오메가-3 지방산)를 2 g/60 kg BW/d가 되도록 경구 투여하였다. 마지막으로 복분자종자유를 제공하는 급이군 또한 45% fat을 함유하는 고지방식을 자율급식으로 제공하며 각 군당 복분자종자유를 1 g/60 kg BW/d, 2 g/60 kg BW/d가 되도록 매일 경구 투여하였다. 실험이 시작된 이후 종료될 때까지 체중은 매주 2회 측정하여 기록하였고, 식이섭취량 또한 일주일에 2회 측정하여 식

이효율을 산출하는 데 이용하였다.

### 식이효율 계산

매주 제공된 사료의 값에서 섭취 후 남은 사료의 값을 제하여 각 군의 식이섭취량을 구하고 체중의 증가와 비교하여 식이효율을 산출해내었고 표로 나타내었다.

$$\text{Food efficiency rate (FER)} = \frac{\text{weight gain (g)}}{\text{food intake (g)}}$$

### 혈액채취 및 장기무게 측정

실험 종료 시 Avertin(2,2,2-Tribromoethanol, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)으로 전신 마취하여 안와 채혈방법을 통해 혈액을 채취하였고, 이는 3.8% sodium citrate(Sigma-Aldrich Co.)와 9:1의 비율로 섞여 혈액 응고를 억제하였다. 개복하여 주요 장기의 변화가 있는지 확인하고 주요 장기의 무게를 측정, 기록하도록 하여 군간 차이가 있는지 확인하였다.

### 혈중 중성지방 및 콜레스테롤 측정

혈액은 1,500×g에서 원심분리(Sorvall™ Legend™ Micro 17 Micro centrifuge, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 하여 혈장을 분리해내었다. 혈구와 분리된 혈장을 멸균된 튜브에 옮기고 혈중 중성지방과 콜레스테롤을 측정하는 데에 이용하였다. 혈중 중성지방 측정은 Triglyceride colorimetric assay kit(Cayman, Ann Arbor, MI, USA)을 이용하였고, 콜레스테롤 측정은 EnzyChrom HDL and LDL/VLDL assay kit(Bioassay system, Hayward, CA, USA)을 이용해 각각의 실험을 진행하였으며, 각각의 흡광도는 SpectraMax 340PC384 Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다.

### Prothrombin time(PT), activated partial thromboplastin time(aPTT) 측정

혈장을 이용하여 PT와 aPTT를 측정하였는데, PT 측정에는 HemosIL RecombiPlasTin 2G(Instrumentation Laboratory, Orangeburg, NY, USA)를 이용하였고, aPTT는 APTT-SP-0020006300(Instrumentation Laboratory) 측정 시약을 이용하여 실험하였는데, 시약과 혈장을 반응시켜 혈액응고측정기기인 ACL9000(Instrumentation Laboratory)에 넣고 혈장이 응고되는 시간을 측정하여 결과 값을 표로 나타내었다.

### 통계처리

본 실험에서 얻어진 모든 분석 자료는 평균±표준오차(mean±SE)로 나타내었으며, 군간 유의성 검증은 Student's t-test 분석법을 실시하여  $P < 0.05$ 와  $P < 0.001$  수준에서 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 복분자종자유의 지방산 조성과 총 폴리페놀 및 플라보노이드

복분자종자유 조성 분석에서(Table 1) 오메가-6 지방산인 linoleic acid(리놀레산)가 42.63%로 가장 높았으며, linolenic acid(리놀렌산)가 23.83%로 다음을 차지하였다. 이 리놀렌산은 오메가-3 지방산의 한 종류이며, EPA와 DHA의 전구체로 작용하여 체내에서 전환이 가능하다고 알려져 있다(9-11). 지방산 조성을 분석한 결과 복분자종자유에 EPA나 DHA는 거의 없지만, 전구체인 리놀렌산이 풍부한 것을 확인하였다. 식물성 리놀렌산이 혈중 지질의 구성에 긍정적인 영향을 준다(34-36)는 연구 결과를 바탕으로 복분자종자유가 혈중 중성지방 및 콜레스테롤 개선 가능성을 가질 것이라고 사료하였다. 또한 비타민 E(37-39)와 플라보노이드, 폴리페놀류(40-43)가 혈액 내에서 강력한 항산화제로써 기능한다는 연구와 플라보노이드에 의해 혈중지질 개선의 효과를 가진다는 보고(44,45)가 있는데, 복분자종자유에 함유된 비타민 E(8.3 mg α-TE/100 g)와 총폴리페놀, 총플라보노이드가 혈중 콜레스테롤 산화 억제 및 개선에 영향을 줄 것으로 기대되었다.

### 복분자종자유의 잔류농약, 곰팡이독소, 세균 및 중금속 검사

식품 내 잔류농약, 곰팡이독소, 세균 수 및 대장균군 수 검사를 실시하여 식용으로 적합하지 확인하였다. 이 복분자종자유의 경우에는 Table 2의 결과와 같이 잔류농약 부분에서 아зок시스트로빈(azoxystrobin, 0.0675 mg/kg)과 플루벤디아마이드(flubendiamide, 0.0778 mg/kg)만이 미량으로 검출되었고 곰팡이독소(총 아플라톡신, 오크라톡신)와 대장균군, 세균은 검출되지 않았다. 식품의약품안전처가 발표한 「식품의 농약 잔류 허용기준」에 따르면 아зок시스트로빈은 복분자에서 3 mg/kg 미만으로 검출될 경우 식품으로의 섭취가 가능하고, 플루벤디아마이드는 복분자에 대한 기준이 없으므로 ADI(잔류농약일일섭취허용량)를 따랐다. 플루벤디아마이드는 ADI가 0.0017 mg/kg BW/d로 60kg의 사람이 섭취할 때 1.02 mg/60 kg BW/d 미만일 경우 식품 섭취가 가능하다. 따라서 복분자종자유는 식품으로 섭취하는 데에 결격사유가 없으므로 동물이나 사람에게 경구 투여하여도 문제되지 않음을 확인하였다.

### 식이효율 및 체중 증가

Table 3의 결과와 같이 식이섭취량의 경우 각 군당 유의적 차이가 나지 않는 반면에, weight gain과 식이효율(FER) 모두에서 음성대조군 대비 양성대조군과 BSO 2 g 급이군의 값이 유의적으로 감소( $P < 0.05$ )한 것을 확인하였다. Table 1에 따르면 복분자종자유는 공액리놀레산(CLA)이 1.11 mg/g, cis-9-, trans-11-CLA, trans-10-, cis-12-CLA가 47.03% 포함되어 있는데, 기존의 연구 결과에 따르면 CLA는 에너지 소비를 증가시키고 체중 감소에 도움이 되는

**Table 1.** Fatty acid composition, total polyphenols, and flavonoids test certificate of the Bokbunja seed oil (BSO)

Test code		Measure	Result
Butyric acid	Capric acid	g/100 g	—
Caproic acid	Caprylic acid	g/100 g	—
Lauric acid	Myristic acid	g/100 g	—
Tridecanoic acid	Undecanoic acid	g/100 g	—
cis-10-Penta decanoic acid	Heptadecanoic acid	g/100 g	—
cis-10-Hepta decanoic acid	Elaidic acid	g/100 g	—
Eicosadienoic acid	Arachinoic acid	g/100 g	—
cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid	Eicosapentaenoic acid	g/100 g	—
cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid	Henicosanoic acid	g/100 g	—
Linoelaidic acid	Docosadienoic acid	g/100 g	—
Pentadecanoic acid	Docohexaenoic acid	g/100 g	—
Erucic acid	Tricosanoic acid	g/100 g	—
Lignoceric acid	Nervonic acid	g/100 g	—
Myristoleic acid		g/100 g	—
Behenic acid		g/100 g	0.14
Palmitic acid		g/100 g	2.09
Palmitoleic acid		g/100 g	0.08
Stearic acid		g/100 g	0.80
Oleic acid		g/100 g	7.95
Linoleic acid		g/100 g	42.63
$\gamma$ -Linolenic acid		g/100 g	0.08
Linolenic acid		g/100 g	23.83
Arachidic acid		g/100 g	0.28
cis-11-Eicosenoic acid		g/100 g	0.18
Vitamin D		$\mu\text{g}/100\text{ g}$	—
Vitamin E		mg $\alpha$ -TE/100 g	8.30
Conjugated linolenic acid (CLA)		mg/g	1.11
cis-9-, trans-11-CLA, trans-10-, cis-12-CLA		%	47.03
Total polyphenol		mg/g	0.68
Total flavonoid		mg/g	1.13
Catechin		mg/g	—

**Table 2.** Residual insecticides, fungal toxins, bacterial counting, and coli form count inspection certificate of the Bokbunja seed oil (BSO)

Test code		Measure	Result
Benzene hexachloride (BHC)	DDT	mg/kg	—
Bifenthrin	Cyhalothrin	mg/kg	—
Carbofuran	Cypermethrin	mg/kg	—
Chlorfenapyr	Cyprodinil	mg/kg	—
Chlorothalonil	Chloropyrifos	mg/kg	—
Chlorpyrifos-methyl	Diazinon	mg/kg	—
Dichlorvos	Dicofol	mg/kg	—
Endosulfan	Fenarimol	mg/kg	—
Fenitrothion	Fenpropathrin	mg/kg	—
Fenvalerate	Fludioxonil	mg/kg	—
Imazalil	Iprodione	mg/kg	—
Isoprothiolane	Malathion	mg/kg	—
Methomyl	Methidathion	mg/kg	—
Paclobutrazol	Phenthoate	mg/kg	—
Permethrin	Phosmet	mg/kg	—
Parathion	Parathion-methyl	mg/kg	—
Primicarb	Procymidone	mg/kg	—
Quintozene	Triadimefon	mg/kg	—
Triflumizole	Triazophos	mg/kg	—
Prochloraz	Methoxyfenozone	mg/kg	—
Boscalid	Acetamiprid	mg/kg	—
Atrazine	Ethion	mg/kg	—
Iprovalicarb	Cabaryl	mg/kg	—
Captan	Tolclofos-methyl	mg/kg	—
Triflumuron	Thiamethoxam	mg/kg	—
Fenhexamid	Pyrachlostrobin	mg/kg	—
Profenofos	Hexaflumuron	mg/kg	—
Flufenoxuron	Pirimiphos-methyl	mg/kg	—
Pyrimethanil		mg/kg	—
Azoxystrobin		mg/kg	0.0675
Flubendiamide		mg/kg	0.0778
Coliform bacteria		—	—
Bacterial population count		/mL	—
Aflatoxin	Ochratoxin	$\mu\text{g}/\text{kg}$	—

**Table 3.** Weight gain, food intake, and food efficiency rate of mice

Group		Weight gain <sup>1)</sup>	Food intake <sup>2)</sup>	FER <sup>3)</sup>
Male	Normal control	9.45±1.20 <sup>*</sup>	8.89±0.34	0.19±0.02 <sup>*</sup>
	Negative control	15.26±0.65 <sup>###</sup>	8.42±0.31	0.34±0.05 <sup>#</sup>
	Positive control	11.42±1.31 <sup>###,*</sup>	8.32±1.16	0.19±0.04 <sup>*</sup>
	BSO 1 g/60 kg BW/d	14.9±1.64 <sup>#</sup>	7.92±1.09	0.32±0.05 <sup>#</sup>
	BSO 2 g/60 kg BW/d	13.6±0.56 <sup>#,*</sup>	8.42±0.55	0.25±0.04 <sup>#,*</sup>
Female	Normal control	8.29±0.61 <sup>*</sup>	8.61±0.46	0.11±0.02 <sup>*</sup>
	Negative control	13.53±0.61 <sup>###</sup>	7.82±1.04	0.26±0.04 <sup>#</sup>
	Positive control	9.42±0.69 <sup>*</sup>	8.28±1.16	0.18±0.03 <sup>#,*</sup>
	BSO 1 g/60 kg BW/d	12.9±0.95 <sup>###</sup>	7.66±0.67	0.28±0.02 <sup>###</sup>
	BSO 2 g/60 kg BW/d	11.4±1.27 <sup>#,*</sup>	7.63±0.63	0.2±0.02 <sup>###,*</sup>

<sup>1)</sup>Weight gain (g)=final body weight - start body weight.

<sup>2)</sup>Food intake (g)= food intake (g/week).

<sup>3)</sup>FER=weight gain (g/week)/ food intake (g/week).

Each results represents the mean±SE (n=6).

<sup>#</sup>P<0.05 and <sup>###</sup>P<0.001 compared with the Normal control.

<sup>\*</sup>P<0.05 compared with the Negative control.

**Table 4.** Average organ weight of each experiment group

		Normal control	Negative control	Positive control	BSO 1 g/ 60 kg BW/d	BSO 2 g/ 60 kg BW/d
Heart	Male	0.22±0.01	0.22±0.02	0.20±0.03	0.23±0.02	0.23±0.02
	Female	0.20±0.04	0.17±0.03	0.22±0.06	0.18±0.03	0.18±0.02
Liver	Male	2.42±0.23	2.21±0.07	1.97±0.10	2.61±0.24	2.55±0.32
	Female	1.84±0.04	1.94±0.08	1.81±0.28	2.12±0.49	1.91±0.28
Kidney	Male	0.75±0.11	0.68±0.05	0.58±0.05	0.66±0.02	0.62±0.07
	Female	0.47±0.06	0.45±0.06	0.53±0.04	0.56±0.02	0.47±0.03
Spleen	Male	0.14±0.02	0.15±0.04	0.17±0.02	0.19±0.05	0.16±0.02
	Female	0.19±0.03	0.17±0.04	0.25±0.05	0.21±0.05	0.15±0.04

Each results represents the mean±SE (n=6).

것으로 알려져 있다(46,47). 이러한 연구 결과를 바탕으로 복분자종자유에 포함된 CLA가 실험동물의 체중 감소와 식이효율 저하에 영향을 미쳤을 것으로 여겨진다.

**복분자종자유 섭취에 따른 장기무게**

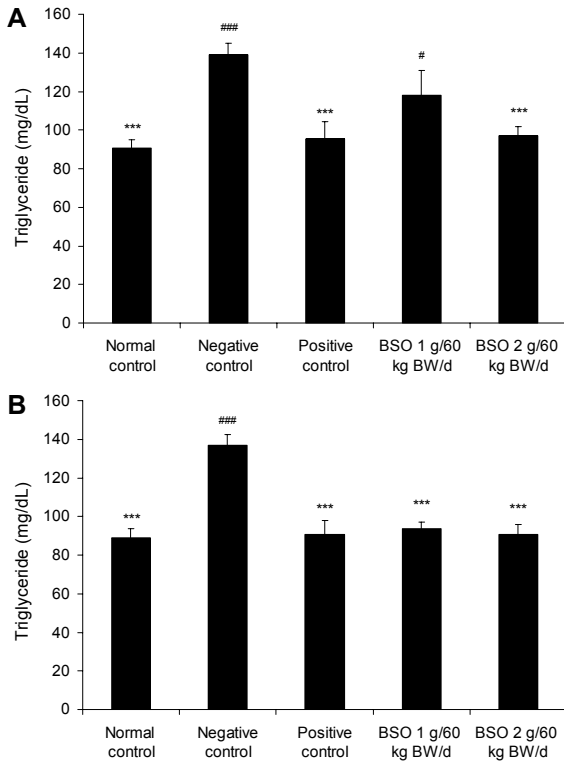
각 군당 장기의 무게(Table 4)는 유의적 차이가 나타나지 않았고 대조군과 실험군 사이에 어떤 해부학적인 이상 또한 나타나지 않았다. 고지혈증을 유도하기 위해 45% fat을 포함하는 고지방식을 섭취하도록 하였고 혈중 중성지방이나 콜레스테롤의 수치가 비정상적으로 증가한 것을 통해 고지혈증이 발병한 것을 확인하였으며 각 장기의 색깔이나 모양이 정상대조군과 차이가 나지 않은 것도 확인하였다.

**혈중 중성지방과 콜레스테롤 변화**

Fig. 1은 수컷 마우스와 암컷 마우스의 혈중 중성지방을 각각 나타낸 그래프이다. 수컷과 암컷 마우스 모두에서 음성대조군의 중성지방 농도가 정상대조군에 비해 유의적인 차이(P<0.001)를 보이며 증가하는 것을 확인하였는데, 수컷 마우스의 정상대조군 혈중 중성지방은 90.69±4.21 mg/dL인 것에 반해 음성대조군은 138.85±6.02 mg/dL로 정상대조군보다 약 65.3% 높은 결과를 보였다. 또한 암컷 마우스

에서도 정상대조군의 혈중 중성지방은 89.19±4.60 mg/dL이고 음성대조군에서는 136.72±5.86 mg/dL로, 음성대조군이 정상대조군에 비해 65.2% 높은 것을 확인하였으며, 45% fat diet를 통해 고지혈증이 유도되었다는 것을 알 수 있었다. 고지혈증이 유도된 수컷 마우스는 양성대조군이 95.40±8.99 mg/dL, BSO 2 g 급이군에서 97.24±4.58 mg/dL로 음성대조군 대비 각각 약 68.71%, 70% 수준으로 감소하며 유의적으로 감소(P<0.001)하는 것을 확인하였다. 그리고 특히 암컷 마우스의 경우에는 음성대조군에 대비하여 양성대조군에서 90.80±7.21 mg/dL로 감소하여 음성대조군 대비 66.4% 수준이 되었고, 복분자종자유 급이군 모두에서 (BSO 1 g은 93.5±3.46 mg/dL로 음성대조군 대비 68.3% 수준, BSO 2 g은 90.63±5.24 mg/dL로 음성대조군 대비 66.3% 수준) 유의적으로 중성지방이 감소(P<0.001)하는 것을 확인하였다.

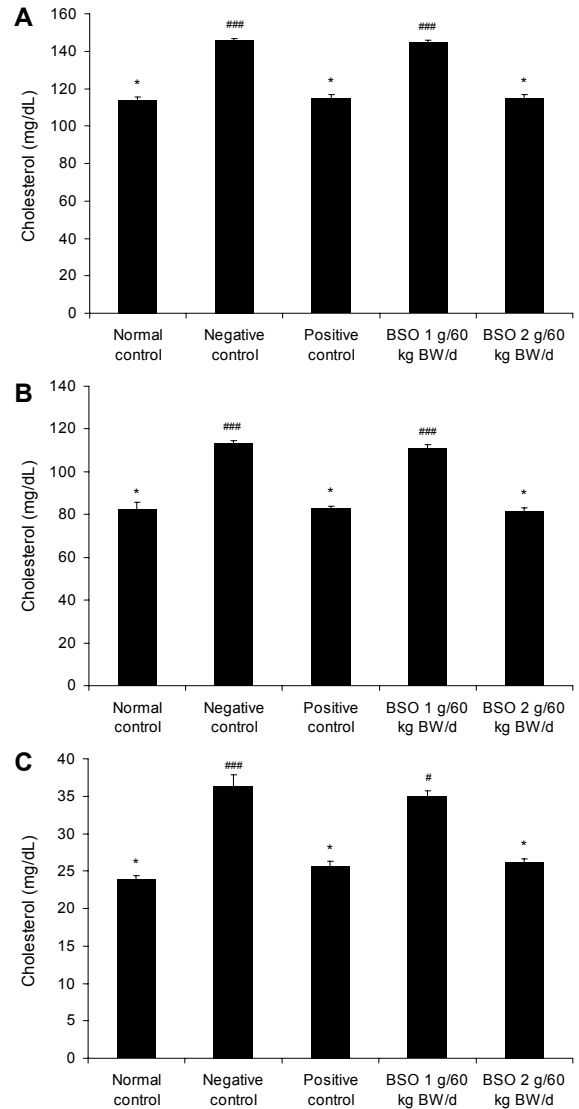
Fig. 2의 A, B, C는 수컷 마우스의 총콜레스테롤, HDL, LDL/VLDL-콜레스테롤의 수치를 그래프로 나타낸 결과이다. 총콜레스테롤은 113.97±1.47 mg/dL에서 146.08±0.70 mg/dL로, HDL-콜레스테롤은 82.50±3.30 mg/dL에서 113.47±1.07 mg/dL로, LDL/VLDL-콜레스테롤은 23.86±0.49 mg/dL에서 36.39±1.49 mg/dL로 증가함으로써 정



**Fig. 1.** Triglycerides of ICR mice. (A) male's triglycerides, (B) female's triglycerides. Each bar represents the mean±SE of 6 mice. #*P*<0.05 and ###*P*<0.001 compared with the Normal control. \*\*\**P*<0.001 compared with the Negative control.

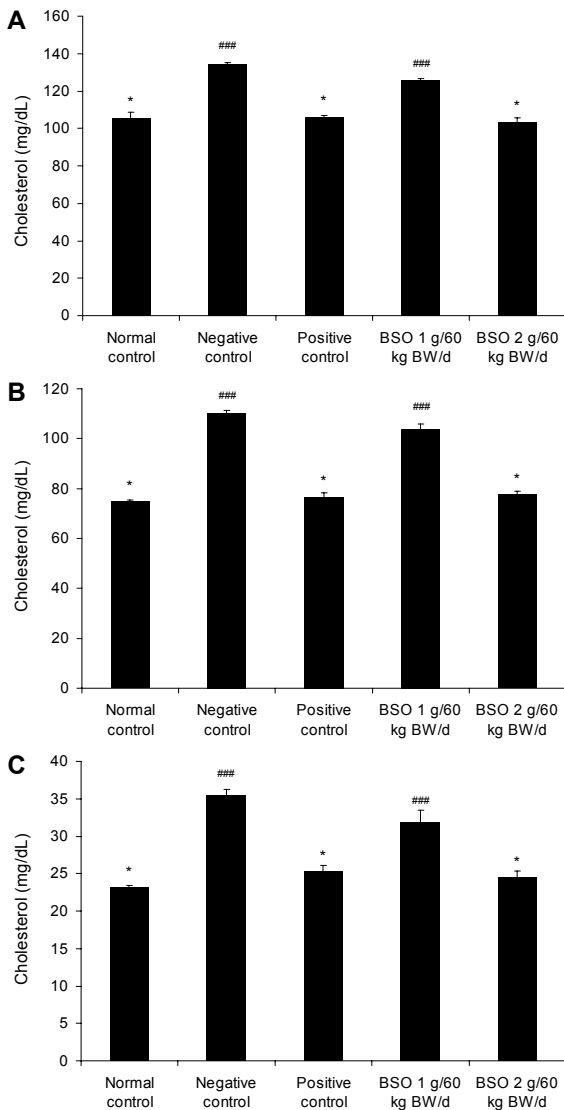
상대조군에 비해 음성대조군의 수치가 유의적으로(*P*<0.001) 높아진 것을 확인하였다. 혈중 중성지방의 결과와 마찬가지로 혈중 콜레스테롤 또한 음성대조군에 비하여 양성대조군(총콜레스테롤은 114.78±1.94 mg/dL, HDL-콜레스테롤은 82.75±1.04 mg/dL, LDL/VLDL-콜레스테롤은 25.62±0.73 mg/dL)과 복분자종자유 급이군(BSO 2 g)(총콜레스테롤은 114.61±2.35 mg/dL, HDL-콜레스테롤은 81.77±1.37 mg/dL, LDL/VLDL-콜레스테롤은 26.22±0.39 mg/dL)에서 유의적으로(*P*<0.05) 감소하는 결과를 얻었다. 그 그래프의 경향을 분석해 보았을 때 HDL-콜레스테롤, LDL/VLDL-콜레스테롤의 양 모두 변함으로써 총콜레스테롤 양도 함께 변하게 된 것으로 생각된다. 양성대조군으로 사용된 시판되는 연어유와 복분자종자유(BSO 2 g)는 혈중 콜레스테롤(총, HDL, LDL/VLDL)의 변화에 긍정적인 영향을 줄 수 있음을 확인하였다.

Fig. 3은 암컷 마우스의 총콜레스테롤 양과 HDL, LDL/VLDL-콜레스테롤 수치를 그래프로 나타낸 결과로서 암컷 마우스도 수컷 마우스와 비슷한 결과가 도출되었다. 암컷 마우스의 혈중 총콜레스테롤이 134.30±1.03 mg/dL로 정상대조군 대비 약 79% 증가하였고 HDL-콜레스테롤은 110.29±1.13 mg/dL로 정상대조군 대비 약 67.6%, LDL/VLDL-콜레스테롤은 35.44±0.79 mg/dL로 정상대조군 대비 약 65.3% 증가함으로써 모두 정상대조군에 비해 음성대조군



**Fig. 2.** Cholesterol of male ICR mice. (A) male's total cholesterol, (B) male's HDL-cholesterol, (C) male's LDL/VLDL-cholesterol. Each bar represents the mean±SE of 6 mice. #*P*<0.05 and ###*P*<0.001 compared with the Normal control, \**P*<0.05 compared with the Negative control.

의 수치가 유의적으로(*P*<0.001) 높아진 것을 확인하였다. 그에 반해 음성대조군에 비하여 양성대조군(총콜레스테롤은 105.98±1.13 mg/dL, HDL-콜레스테롤은 76.75±1.66 mg/dL, LDL/VLDL-콜레스테롤은 25.2±0.88 mg/dL)과 복분자종자유 급이군(BSO 2 g)(총콜레스테롤은 103.73±2.09 mg/dL, HDL-콜레스테롤은 77.80±1.7 mg/dL, LDL/VLDL-콜레스테롤은 24.44±0.91 mg/dL)은 유의적으로(*P*<0.05) 감소하는 결과를 얻었다. 수컷의 결과와 마찬가지로 HDL-콜레스테롤, LDL/VLDL-콜레스테롤의 증감에 따라 총콜레스테롤의 양 모두 변하게 된 것으로 생각되며 양성대조군으로 사용된 시판 연어유와 복분자종자유(BSO 2 g)는 수컷뿐만 아니라 암컷 마우스에서도 혈중 콜레스테롤(총, HDL, LDL/VLDL)의 변화에 긍정적인 영향을 줄 수 있

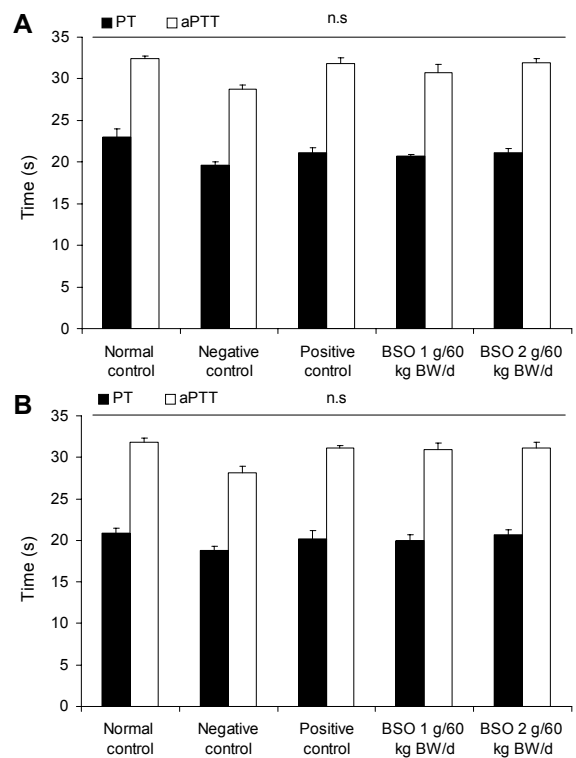


**Fig. 3.** Cholesterol of female. (A) female's total-cholesterol, (B) female's HDL-cholesterol, (C) female's LDL/VLDL-cholesterol. Each bar represents the mean±SE of 6 mice. #*P*<0.05 and ###*P*<0.001 compared with the Normal control, \**P*<0.05 compared with the Negative control.

음을 확인하였다. 이러한 결과는 복분자종자유 내에 포함되어 있는 오메가-3 지방산뿐만 아니라 폴리페놀류와 플라보노이드의 혈중지질 개선 효과에 의한 것으로 사료된다.

**PT, aPTT 결과**

Fig. 4에 나타난 바와 같이 PT와 aPTT 모두에서 대조군과 실험군 사이에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. Fig. 4A는 수컷 마우스의 PT와 aPTT를 나타낸 그래프로 음성대조군의 PT는 19.62±1.05초, aPTT는 28.73±0.74초로 정상대조군 대비하여 혈장응고시간이 각각 약 85.4%, 71.4% 수준으로 감소하는 경향, 즉 혈액이 좀 더 빨리 굳는 경향을 보인 반면에 양성대조군으로 사용된 시판 연어유나 복분자종자유를 먹인 마우스의 PT는 각각 21.10±0.52초, 20.7



**Fig. 4.** PT and aPTT of male and female. (A) male PT and aPTT, (B) female PT and aPTT. Each bar represents the mean±SE of 6 mice. NS: no significance.

±0.23초, 21.15±0.39초로 혈장응고시간이 유의적으로 증가하지는 않았다. 마찬가지로 aPTT 또한 각각 31.82±0.69초, 30.72±1.12초, 31.93±0.54초로 음성대조군에 대비하여 그 시간이 유의미하게 증가하지 않았다. 또한 Fig. 4B는 암컷 마우스의 PT와 aPTT 값을 나타낸 것으로 수컷 마우스의 결과와 마찬가지로 음성대조군의 PT는 18.82±0.10초, aPTT는 28.17±1.20초로 정상대조군 대비하여 혈장응고시간이 각각 약 90.1%, 88.7% 수준으로 감소하는 경향, 즉 혈액이 좀 더 빨리 굳는 경향을 보였다. 반면 양성대조군으로 사용된 연어유나 복분자종자유를 먹인 마우스의 PT는 각각 20.10±1.55초, 19.97±0.18초, 20.68±0.98초로 혈액응고시간이 유의적으로 증가하지는 않았으며, 마찬가지로 aPTT 또한 각각 31.08±1.20초, 30.93±0.48초, 31.15±0.74초로 음성대조군에 대비하여 혈장응고시간이 유의적으로 증가하지 않았다. 이러한 실험 결과를 바탕으로 복분자종자유의 섭취가 혈장응고시간 증가에 유의적 차이를 나타내지 못하는 것으로 확인되었다.

지금까지의 결과에서 복분자종자유가 혈중 중성지방과 콜레스테롤의 수치를 낮추는 데에 긍정적 영향을 미치는 것을 확인하였으나, 혈전 형성 억제 실험에 대해서는 유의적인 효과를 나타내지는 못하였다. 그러나 앞선 결과들을 종합해 본 결과 복분자종자유가 혈중 지방 수치에 미치는 긍정적인 영향에 의해 혈액순환 개선 가능성을 보일 것으로 사료되며, 실제로 혈전 형성 억제에 유의적인 영향을 미치는지에 대한

추후 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

## 요 약

본 실험의 복분자종자유는 리놀렌산 238.3 mg/g, 리놀레산과 감마리놀렌산 427.1 mg/g을 포함하며 이는 고시된 범위 내의 섭취량이므로 독성시험 없이 4주 동안 매일 경구 투여로 암컷과 수컷 쥐 모두에게 섭취하도록 하였다. 또한 성인 정상체중을 약 60 kg으로 설정하고 60 kg의 성인이 하루 1 g, 2 g을 각각 섭취할 때의 혈중 지방의 감소 효과를 알아보기 위해 급이군의 설정을 1 g/60 kg BW/d(BSO 1 g), 2 g/60 kg BW/d(BSO 2 g)로 정하였다. 양성대조군의 경우에 판매되는 연어유 1,000 mg 캡슐을 2정 섭취하는 것을 권장하였고, 이에 맞추어 2 g/60 kg BW/d로 설정하게 되었다. 실험기간 종료 후 마우스를 희생시켜 혈액을 얻었으며, 복분자종자유(BSO 2 g)를 섭취한 마우스에서 총콜레스테롤 및 HDL, LDL/VLDL-콜레스테롤과 혈중 중성지방이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다( $P < 0.05$ ). 이를 종합해 보았을 때 복분자종자유는 고지혈증 상태를 개선하고 미약하지만 항응고 활성을 통해 혈액의 항상성을 유지하도록 돕는 작용을 한다고 할 수 있다. 따라서 앞으로 동물 유래가 아닌 식물유래 복분자종자유를 이용한다면 고지혈증 개선 효과와 혈액 항응고 활성을 조절할 수 있을 것이며, 더욱 다양한 표적 인자 분석을 통하여 복분자종자유 고지혈, 항응고 및 혈행개선 기전연구가 가능할 것이라 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 (재)호남광역경제권 선도산업육성사업 라이프케어사업(과제번호:R0002192)의 일환으로 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Cho SH. 1994. Dietary lipid and atherosclerosis. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 170-179.
2. Lee YS, Lee MY, Lee SY. 2014. The risk of metabolic syndrome by dietary patterns of middle-aged adults in Gyeonggi province. *Korean J Community Nutr* 19: 527-536.
3. Park YS, Park HJ, Won SI. 2011. Association of fatty acid intake and dyslipidemia in Korean adults: Korea national health and nutrition survey, 1998-2007. *J East Asian Soc Dietary Life* 21: 789-807.
4. Statistics Korea. 2014. *2013 cause of death statistics*. Statistics Korea, Daejeon, Korea. p 4-43.
5. Hong SJ, Oh DJ, Kim EJ, Lee SJ, Shin SH, Choi JI, Choi CW, Park JS, Ahn JC, Park CG, Seo HS, Ro YM. 2003. The comparison of serum lipid levels and risk factors according to the status of coronary atherosclerosis in Koreans. *Korean Circ J* 33: 465-474.
6. Hwang WM, Bae JH, Kim KY, Synn YC. 2005. Impacts of atherosclerotic coronary risk factors on atherosclerotic surrogates in patients with coronary artery disease. *Korean Circ J* 35: 131-139.
7. Chung HK, Shin MJ, Cha YJ, Lee KH. 2011. Effect of onion peel extracts on blood lipid profile and blood coagulation in high fat fed SD rats. *Korean J Food & Nutr* 24: 442-450.
8. Cheon JH, Lee JY, Kim JH, Park MH, Lee SH, Kong CS, Kim YY, Yu KH, Kim MH. 2015. Effects of fermented *Saragassum thunbergii* on platelet aggregation and serum lipid levels in obese rat induced by high fat diet. *Journal of Life Science* 25: 456-462.
9. Lim HJ, Cho KH, Choue R. 2005. The effects of functional tea (*Mori Folium*, *Lycii Fructus*, *Chrysanthemi Flos*, *Zizyphi Fructus*, *Sesamum Semen*, *Raphani Semen*) supplement with medical nutrition therapy on the blood lipid levels and antioxidant status in subjects with hyperlipidemia. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 42-56.
10. Lee MJ, Lee SJ, Choi HR, Lee JH, Jeong JT, Choi KM, Cha JD, Hwang SM, Park JH, Lee JH, Lee TB. 2014. Cholesterol improvement effects of co-treatment with black raspberry and red ginseng extracts in mice fed a high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1491-1499.
11. Sanders TAB, Lewis F, Slaughter S, Griffin BA, Griffin M, Davies I, Millward DJ, Cooper JA, Miller GJ. 2006. Effect of varying the ratio of n-6 to n-3 fatty acids by increasing the dietary intake of  $\alpha$ -linolenic acid, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid, or both on fibrinogen and clotting factors VII and XII in persons aged 45-70 y: the OPTILIP study. *Am J Clin Nutr* 84: 513-522.
12. Lee SN, Park HK, Kim YE, Hwang IH, Huh BY. 1991. Lipid-lowering effect of omega-3 fatty acid in patients with hypercholesterolemia. *J Korean Acad Fam Med* 12: 1-7.
13. Laidlaw M, Holub BJ. 2003. Effects of supplementation with fish oil-derived n-3 fatty acids and  $\gamma$ -linolenic acid on circulating plasma lipids and fatty acid profiles in women. *Am J Clin Nutr* 77: 37-42.
14. Robinson JG, Stone NJ. 2006. Antiatherosclerotic and antithrombotic effects of omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol* 98: 39-49.
15. Lovegrove JA, Lovegrove SS, Lesauvage SV, Brady LM, Saini N, Minihane AM, Williams CM. 2004. Moderate fish-oil supplementation reverses low-platelet, long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid status and reduces plasma triacylglycerol concentrations in British Indo-Asians. *Am J Clin Nutr* 79: 974-982.
16. Thies F, Garry JM, Yaqoob P, Rerkasem K, Williams J, Shearman CP, Gallagher PJ, Calder PC, Grimble RF. 2003. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet* 361: 477-485.
17. Djoussé L, Arnett DK, Carr JJ, Eckfeldt JH, Hopkins PN, Province MA, Ellison RC. 2005. Dietary linolenic acid is inversely associated with calcified atherosclerotic plaque in the coronary arteries: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Circulation* 111: 2921-2926.
18. Lopez-Garcia E, Schulze MB, Manson JE, Meigs JB, Albert CM, Rifai N, Willett WC, Hu FB. 2004. Consumption of (n-3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women. *J Nutr* 134: 1806-1811.
19. Ambring A, Johansson M, Axelsen M, Gan L, Strandvik B, Friberg P. 2006. Mediterranean-inspired diet lowers the ratio of serum phospholipid n-6 to n-3 fatty acids, the number of leukocytes and platelets, and vascular endothelial growth factor in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 83: 575-581.



20. Jeong S, Kim JY, Paek JE, Kim J, Kwak JS, Kwon O. 2013. Systematic review of the effect of omega-3 fatty acids on improvement of blood flow while focused on evaluation of claims for health functional food. *J Nutr Health* 46: 226-238.
21. Jeon YH, Choi SW, Kim MR. 2009. Antimutagenic and cytotoxic activity of ethanol and water extracts from *Rubus coreanum*. *Korean J Food Cookery Sci* 25: 379-386.
22. Kim MJ, Lee U, Kim SH, Chung HG. 2002. Variation of leaf, fruiting characteristics in *Rubus coreanus* Miq. *Korean J Breed* 34: 50-56.
23. Cha HS, Youn AR, Park PJ, Choi HR, Kim BS. 2007. Comparison of physiological activities of *Rubus coreanus* and Miquel during maturation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 683-688.
24. Lee MJ, Lee SJ, Choi HR, Lee JH, Kwon JW, Chae KS, Jeong JT, Lee TB. 2014. Improvement of cholesterol and blood pressure in fruit, leaf and stem extracts from black raspberry *in vitro*. *Korean J Medicinal Crop Sci* 22: 177-187.
25. Ohtani K, Miyajima C, Takahasi T, Kasai R, Tanaka O, Hahn DR, Naruhashi N. 1990. A dimeric triterpene-glycoside from *Rubus coreanus*. *Phytochemistry* 29: 3275-3280.
26. Kim YH, Kang SS. 1993. Triterpenoids from *Rubus Fructus* (Bogbunja). *Arch Pharm Res* 16: 109-113.
27. Choi MR, Lee MY, Kim JE, Hong JE, Jang K, Lee JY, Chun JW, Kim TH, Shin HK, Kim EJ. 2012. *Rubus coreanus* Miquel improves on impairment of memory in senescence-accelerated mouse (SAM). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1253-1258.
28. Choung MG, Lim JD. 2012. Antioxidant, anticancer and immune activation of anthocyanin fraction from *Rubus coreanus* Miquel fruits (Bokbunja). *Korean J Medicinal Crop Sci* 20: 259-269.
29. Jeong HS, Han JG, Ha JH, Kim Y, Oh SH, Kim SS, Jeong MH, Choi GP, Park UY, Lee HY. 2009. Antioxidant activities and skin-whitening effects of nano-encapsulated water extract from *Rubus coreanus* Miquel. *Korean J Medicinal Crop Sci* 17: 83-89.
30. Choe M, Shin GJ, Choi GP, Do JH, Kim JD. 2003. Synergistic effects of extracts from Korean red ginseng, *Saururus chinensis* (Lour.) Baill. and *Rubus coreanus* Miq. on antioxidative activities in rats. *Korean J Medicinal Crop Sci* 11: 148-154.
31. Won KS, Lee TW, Eun JS, Song JM. 2003. Effect of *Rubus coreanus* Miquel on the specific immune response in mice. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 17: 656-661.
32. Kwon MC, Kim CH, Na CS, Kwak HG, Kim JC, Lee HY. 2007. Comparison of immuno-modulatory regulatory activities of *Rubus coreanus* Miquel by ultra high pressure extracts process. *Korean J Medicinal Crop Sci* 15: 398-404.
33. Shin H, Lee H. 2010. Effects of pharmacopuncture with *RUBI FRUCTUS* infusion solution at KI<sub>10</sub> on osteoporotic rats induced by ovariectomy. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society* 27: 99-114.
34. Karvonen HM, Aro A, Tapola NS, Salminen I, Uusitupa MI, Sarkkinen ES. 2002. Effect of  $\alpha$ -linolenic acid-rich *Camelina sativa* oil on serum fatty acid composition and serum lipids in hypercholesterolemic subjects. *Metabolism* 51: 1253-1260.
35. Zatonski W, Campos H, Willett W. 2008. Rapid declines in coronary heart disease mortality in Eastern Europe are associated with increased consumption of oils rich in alpha-linolenic acid. *Eur J Epidemiol* 23: 3-10.
36. Ayerza R, Coates W. 2005. Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutrition Research* 25: 995-1003.
37. Bae JH, Kim KB, Kim KS, Han SW, Kim YN, Park SY, Lee IK, Kim KY, Nam CW, Huh IS, Lee HJ, Lee SM. 1998. The effect of vitamin E on the endothelial function following a single high-fat meal in normal subjects, patients with coronary heart disease and patients with diabetes. *Korean Circulation J* 28: 1538-1551.
38. Lim JY, Kim OH, Kim JH. 2006. Effects of antioxidant supplementation on lipid profiles in elderly women. *Korean J Community Nutr* 11: 133-142.
39. Lee CM. 2000. The effect of the administration of red ginseng and vitamin E on the activation of antioxidizing enzyme and the formation of lipid peroxidation in blood. *The Korean Journal of Physical Education* 39: 476-488.
40. Jo HJ, Kim JW, Yoon JA, Kim KI, Chung KH, Song BC, An JH. 2014. Antioxidant activities of Amaranth (*Amaranthus* spp. L.) flower extracts. *Korean J Food & Nutr* 27: 175-182.
41. Chung SH, Moon YJ, Kim SG, Kim KY, Lee KT, Kim HK, Whang WK. 2008. Isolation of flavonoids from *Carthami flos* and their antioxidative activity. *Yakhak Hoeji* 52: 241-251.
42. Park S, Chae KS, Son RH, Jung J, Im Y, Kwon JW. 2012. Quality characteristics and antioxidant activity of bokbunja (black raspberry) vinegars. *Food Eng Prog* 16: 340-346.
43. Lee JW, Do JH. 2000. Determination of total phenolic compounds from the fruit of *Rubus coreanum* and antioxidative activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 943-947.
44. Choi Y, Lee YJ, Lee S, Chae C, Park S, Kim SS, An H, King D, Han C, Hong H. 2012. Effect of concentrated Dangyooja-derived flavonoids extract added to citrus beverage on obesity and blood lipids in rats. *Kor J Hort Sci Technol* 30: 214-219.
45. Lee SJ, Park HJ, Song Y, Jang SH, Goo AJ, Ko YG, Cho JH. 2014. Antioxidant activity and anti-obesity effect of *Coprinus comatus* in Zucker rat (*fafa*). *Korean J Ver Serv* 3: 51-58.
46. Terpstra AH, Beynen AC, Everts H, Kocsis S, Katan MB, Zock PL. 2002. The decrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy expenditure and energy loss in the excreta. *J Nutr* 132: 940-945.
47. Gaullier JM, Halse J, Høye K, Kristiansen K, Fagertun H, Vik H, Gudmundsen O. 2005. Supplementation with conjugated linoleic acid for 24 months is well tolerated by and reduces body fat mass in healthy, overweight humans. *J Nutr* 135: 778-784.