

발효 블루베리 부산물이 반려견의 체지방 감소 및 체중 관리에 미치는 영향

홍 선 화[†]

주식회사 봄봄 대표

Effect of Fermented Blueberry Byproducts on Body Fat Reduction and Weight Management in Companion Dogs

Sun-Hwa Hong[†]

CEO, BOMBOM Co., Ltd., Paju 10863, Republic of Korea

ABSTRACT

The development of functional pet food using fermented blueberry byproducts is emerging as a promising approach for managing obesity and metabolic diseases in companion animals. This preliminary study aimed to investigate the dietary potential of fermented blueberry byproduct extract (BBFE) for weight management through integrated biochemical, cellular, and animal-based experiments. Fermentation significantly enhanced the total polyphenol content (10.8% increase), total flavonoid content (10.2% increase), and total anthocyanin content (19.5% increase) of blueberry byproducts compared to non-fermented extracts. The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity was enhanced by 20.6%. In 3T3-L1 preadipocyte differentiation assays, BBFE inhibited lipid accumulation in a dose-dependent manner, with a maximum inhibition of 47% at 200 µg/mL, comparable to the positive control, *Garcinia cambogia*. Western blot analysis demonstrated that BBFE suppressed the expression of key transcription factors (PPAR-γ, C/EBP-α, C/EBP-β, and C/EBP-δ) involved in adipogenesis, indicating multi-stage inhibition of the differentiation pathway. In a 12-week feeding trial with 9 beagle dogs (n=7 treatment, n=2 control), BBFE-containing feed resulted in a significantly lower relative body weight gain (23.1% vs. 71.1% in the control group). Serum triglycerides showed marked improvements in individual animals, with reductions exceeding 60% in some subjects. Hepatic and renal function markers remained within normal ranges throughout the study, confirming the safety of the fermented byproduct as a pet food ingredient. These results suggest that fermented blueberry byproducts may offer beneficial dietary value for weight management mediated through inhibition of the PPAR-γ pathway, with favorable metabolic and safety profiles in companion animals. This functional ingredient warrants further investigation for commercial use in pet food formulations for obesity management.

Key words: blueberry byproducts, fermentation, anti-obesity, PPAR-γ, companion animals

서 론

반려동물의 비만은 전 세계적으로 증가하는 동물보건 문제이며, 전체 반려견의 약 50% 이상이 비만 또는 과체중 상태인 것으로 보고되고 있다. 비만은 단순한 외형상의 문제를 넘어 당뇨병, 관절염, 심혈관 질환 등 다양한 대사질환의 위험인자로 작용하며, 반려동물의 삶의 질 저하 및 수명 단축으로 이어진다. 따라서 반려동물 영양관리 분야에서 과학적 근거를 바탕으로 한 비만 관리 전략의 개발은 매우 중요한 과제이다.

전통적인 비만 치료 방법은 식이 제한, 운동 유도 등의 생활습관 개선을 기본으로 하지만, 이러한 접근법의 효과는 동물의 개별 특성, 식욕 조절 능력, 환경 요인 등에 따라 개

인차가 크다. 최근 국내외 펫 케어 산업은 기능성 사료를 통한 생리활성 성분의 투여를 통해 비만을 근본적으로 관리하려는 시도를 강화하고 있다. 특히 천연 식물 유래 물질의 생물 활성을 과학적으로 검증하고 동물 모델에서 안전성을 확인하는 것이 산업 응용의 핵심 과제로 대두되고 있다.

블루베리(*Vaccinium corymbosum*)는 높은 항산화 활성을 가진 베리류 중 하나로, 주요 활성 성분은 안토시아닌, 폴리페놀, 플라보노이드 등이며 이들은 세포 수준의 항산화, 항염증, 항비만 효과를 나타낸다. 블루베리 부산물(블루베리 처리 과정에서 발생하는 과피, 종자, 미성숙 열매 등)은 산업적으로 광범위하게 배출되는 유기성 폐기물이나, 생리활성 물질의 함량이 가공 과정 중인 신선한 블루베리와 유사한 수준으로 보고된 바 있다. 따라서 블루베리 부산물의 기능성 가축 및 반려동물 사료로의 자원화는 순환 경제 실현과 동시에 반려동물 건강 관리에 기여할 수 있다.

[†] Corresponding author : Sun-Hwa Hong, Tel: +82-43-649-7315, E-mail: coolflam@nate.com

발효는 전통적인 식품 가공 방법으로, 미생물의 신진대사 과정에서 생성되는 다양한 효소에 의해 원재료의 세포벽이 분해되고, 결합된 생리활성 물질이 유리되는 과정을 거친다. 이러한 발효 과정은 천연 물질의 폴리페놀 함량을 증가시키고, glycoside 형태의 화합물을 aglycone 형태로 전환시켜 생물 이용률을 향상시키는 것으로 알려져 있다. 한약 유래 물질의 발효를 통한 생리활성 증강에 관한 선행 연구들이 진행되어 왔으나, 블루베리 부산물의 발효를 통한 항비만 효능 평가와 반려견을 대상으로 한 임상 검증은 제한적이다.

비글견(Beagle dogs)은 체중, 대사 특성 및 생리적 반응이 비교적 균일하여 영양학 및 대사 연구에서 표준 실험동물 모델로 널리 사용되고 있다(Chengelis CP 등 2006). 또한 반려견을 대상으로 한 체중 관리 및 기능성 사료 연구에서도 비글견을 포함한 반려견 모델이 널리 활용되고 있으며, 식이 조절을 통한 체중 및 대사 개선 효과 평가에 적합한 모델로 보고되고 있다(Chapman M 등 2019).

따라서 본 연구는 다음 세 가지 목표를 설정하였다. 첫째, 발효 처리가 블루베리 부산물의 항산화 활성에 미치는 영향을 평가한다. 둘째, 3T3-L1 지방세포 모델을 이용하여 BBFE의 지질 축적 억제 기전을 분자 수준에서 확인한다. 셋째, 비글견을 대상으로 한 12주 급여 실험을 통해 기능성 사료의 체중 관리 조절 가능성 및 안전성을 평가하는 예비 연구를 진행한다.

본 연구의 결과는 발효 블루베리 부산물을 체중 관리 조절을 위한 식이 소재로 활용할 수 있는 가능성을 시사하며, 나아가 블루베리 부산물의 산업적 자원화와 반려동물 건강 관리 산업의 고도화에 기여할 것으로 예상된다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 준비

블루베리 부산물은 전라북도 순창군에서 2018년 9월경에 수확한 블루베리(*Vaccinium corymbosum* L.)를 (재)발효 미생물 산업진흥원에서 발효 후 부산물만을 제공받아 사용하였다. 발효에 사용한 균주는 (재)발효미생물 산업진흥원에서 보유하고 있는 청국장 유래 미생물균주(KACC36659P)로 *Lactobacillus* 속에 해당하며, 균주의 배양은 MRS broth(Difco Co., Detroit, MI, USA) 배지를 사용하였다.

블루베리 부산물 발효 분말 제작에 사용된 장비는 착즙기(Hurom HE Series, Hurom Group Co., Gimhae, Gyeongnam, Korea), 원심분리기(VS-6000CFN, Vison Co., Daejeon, Korea), 환류추출기(EYELA SB-100, Tokyo, Japan), 동결건조기(Operon FDU-8606, Gimpo, Korea)이다.

닭가슴살(chicken breast)과 닭간(chicken liver)은 하림(Harim, Iksan, Korea)에서 구입하였으며, 구입 후 당일 또는 냉동(-20℃)하여 실험 전까지 보관하였다.

항산화 활성 평가에 사용된 시약은 Folin-Ciocalteu's phenol reagent, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), quercetin, ascorbic acid 모두 Sigma(St. Louis, USA)사 제품을 사용하였으며, 흡광도 측정은 microplate reader(Molecular Spectramax 340, CA, USA)를 이용하였다.

세포실험에 사용된 3T3-L1 세포는 ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, MD)에서 분양받았으며, 배양 시 1% penicillin-streptomycin(P/S Gibco Co, Gaithersburg, MD, USA), 10% bovine calf serum(BCS, Gibco BRL), Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 사용하였다. 분화 유도에 사용된 시약은 1 μM dexamethasone(Sigma, USA), 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(Sigma, USA), 5 μg/mL insulin(Sigma, USA)이며, 세포 생존율 측정을 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT, Sigma, USA)를 사용하였다. 단백질 발현 분석을 위한 Western blot에 사용된 시약은 Protein lysis buffer(iNtRON Biotech, Seongnam, Korea), BCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher Scientific, MA, USA), Polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane, enhanced chemiluminescence(ECL) reagents kit(Millipore, USA)이며, 항체는 Anti-PPAR-γ(sc-7273), anti-C/EBP-α(sc-166258), antiC/EBP-β(sc-150), anti-C/EBP-δ(sc-151)를 Santa Cruz Biotechnology, Inc.(CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 동물실험에 사용된 비글견은 Orient Bio Co., Ltd.(Korea)에서 분양받았으며, 혈액생화학 분석에 사용한 총 콜레스테롤, 중성지방, 고밀도 지단백 콜레스테롤, 저밀도 지단백 콜레스테롤은 아산제약(주)(Seoul, Korea) 제품을 사용하였다.

2. 블루베리 부산물 추출물(BBPE) 제작

블루베리 부산물 추출물(blue berry peel extract; BBPE)을 제작하기 위하여 수확한 블루베리를 착즙기(Hurom HE Series, Hurom Group Co., Gimhae, Gyeongnam, Korea)를 이용하여 착즙한 후 부산물만을 따로 모아 식품건조기(Lequip LD-9013, Lequip co., Hwaseong, Gyeonggi, Korea)를 이용하여 건조를 진행하였다. 충분히 건조된 블루베리 부산물을 분쇄기에 넣어 10 mesh의 사이즈로 분쇄한 후 사용하기 전까지 -20℃에서 보관하였다. 곱게 간 블루베리 부산물 200 g을 3차 증류수 2 L와 함께 열수 추출을 총 3회 반복 수행하였다. 추출된 블루베리 부산물 추출물을 40±5℃에서 저온압축을 진행하였고, -80℃에서 24시간 동결 후 동결건조기를 통하여 건조를 진행하여 113.4 g의 분말을 얻었으며(수율 56.7%) 실험에 사용할 때에는 분말을 3차 증류수에

녹여 최종적으로 블루베리 부산물 추출물(BBPE)을 제작하였다(Fig. 1).

3. 블루베리 부산물 발효 추출물(BBFE) 제작

블루베리 부산물 발효 추출물(blue berry peel fermented extract; BBFE)의 제작 공정은 다음과 같다. 분쇄 후 건조된 블루베리 부산물에 85℃에서 45분간 저온 살균을 수행하였다. 균주는 MRS broth(Difco Co., Detroit, MI, USA) 배지에 24시간동안 배양한 후, 배양액 2%(v/v)를 멸균된 블루베리 부산물에 접종하고 37℃에서 96시간 정치 배양(IL-21, Jeio tech., Daejeon, Korea)을 진행하였다. 배양이 완료된 배양액은 원심분리기(VS-6000CFN, Vison Co., Daejeon, Korea)를 이용하여 3,000 rpm에서 10분 동안 분리한 후 상등액을 -80℃에서 24시간 동결하고 동결건조기를 통하여 건조를 진행하여 최종적으로 블루베리 부산물 발효 추출물(BBFE)을 제작하였다(Fig. 2). 발효에 사용한 균주(KACC36659P)는 30℃, 150 rpm에서 2일간 배양한 후 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 멸균수로 3회 세척한 뒤 블루베리 부산물 발효에 사용하였다.

4. 항산화 활성 측정

발효 전후 블루베리 부산물 추출물의 항산화 활성을 비교 분석하기 위해 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, DPPH 라디칼 소거능, 총 안토시아닌 함량을 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법을 변형하여 측정하였다(Folin O & Denis W 1912). 블루베리 부산물 추출물(BBPE)과 블루베리 부산물 발효 추출물(BBFE)을 0.2 mL씩 취하고, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 0.2 mL를 첨가하여 혼합한 후 3분간 실온에 방치하였다. 3분 후 10% Na₂CO₃ 0.4 mL를 가하여 혼합하고, 증류수를 4 mL 첨가한 후 차광하여

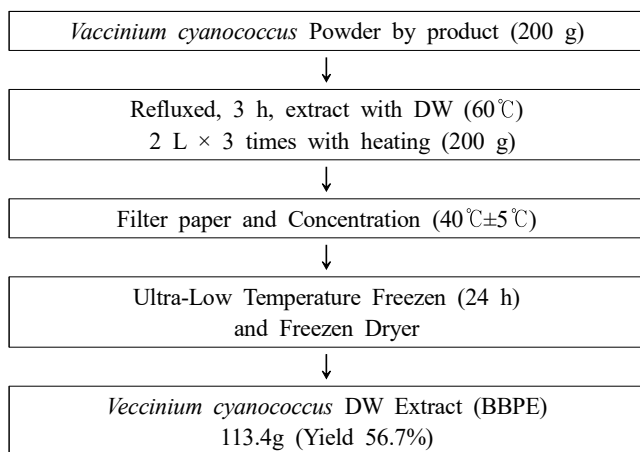


Fig. 1. Schematic representation of *Vaccinium cyanococcus* distilled water extract.

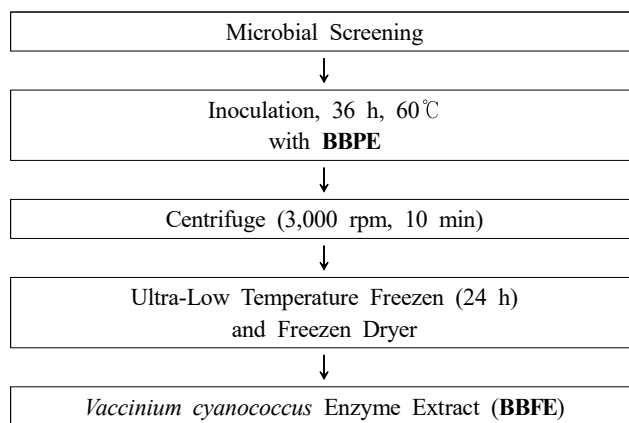


Fig. 2. Schematic representation of *Vaccinium cyanococcus* fermented extract.

실온에 1시간 방치한 후 725 nm에서 Microplate reader로 측정하였다. 총 폴리페놀 화합물은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

총 플라보노이드 함량은 Zhuang의 방법을 변형하여 측정하였다(Zhuang XP 등 1992). 블루베리 부산물 추출물(BBPE)과 블루베리 부산물 발효 추출물(BBFE)을 각각 0.1 mL씩 넣고 2% AlCl₃ ethanol solution 0.1 mL를 가하여 실온에서 1시간 방치한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 quercetin을 사용하였으며, 표준물질의 검량선과 비교하여 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

DPPH는 ascorbic acid를 양성 대조군으로 하였으며, 블루베리 부산물 추출물(BBPE)과 블루베리 부산물 발효 추출물(BBFE)을 각각 20 µL 처리하고, DPPH solution(1 mM) 180 µL를 혼합한 후 실온에서 10분 동안 반응하고 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 다음 식으로 계산하였다:

$$\text{DPPH radical scavenging ability(\%)} = [1 - (\text{Sample}_{\text{abs}} / \text{Blank}_{\text{abs}})] \times 100$$

여기서 Sample_{abs}는 시료 첨가시의 흡광도, Blank_{abs}는 공시험의 흡광도이다.

총 안토시아닌 정량은 pH differential method(Hosseiniian FS 등 2008)에 따라 측정하였다. 블루베리 부산물 추출물(BBPE)과 블루베리 부산물 발효 추출물(BBFE)을 0.025 M KCl buffer(pH 1.0)와 0.4 M sodium acetate buffer(pH 4.5)에 각각 혼합하여 microplate reader를 이용하여 510 nm와 700 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 총 안토시아닌 함량은 cyanidin-3-O-glucoside 기준으로 다음 식을 이용하여 계산하였다:

Absorbance = ($A_{510 \text{ nm pH } 1.0} - A_{700 \text{ nm pH } 1.0}$) - ($A_{510 \text{ nm pH } 4.5} - A_{700 \text{ nm pH } 4.5}$),

총 안토시아닌(mg/100 g) = $[(A \times MW \times DF \times V \times E) / (e \times 1)]$,

여기서 A는 흡광도(Absorbance), ϵ 는 cyanidin-3-O-glucoside의 molar absorptivity(26,900), MW는 안토시아닌 분자량 cyanidin-3-O-glucoside의 분자량 (449.2), DF는 희석 배수, V는 최종부피(mL), E는 시료 100 g당으로 환산하기 위한 값이다.

5. 3T3-L1 지방세포 분화 억제능

3T3-L1 세포는 ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, MD)로부터 분양받아 사용하였고 1% penicillin-streptomycin(P/S Gibco Co, Gaithersburg, MD, USA)과 10% bovine calf serum(BCS, Gibco BRL)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지에서 37℃, 5% CO₂조건에서 배양하였으며 배양액은 2일 마다 교환하였다. 배양된 3T3-L1 지방 세포가 70%가 confluent 되었을 때 phosphate buffered saline(PBS)로 세척 후 0.25% trypsin-EDTA를 이용하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 3분간 정지한 뒤 탈착하여 계대배양 하였다. 탈착된 세포는 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지에 현탁시킨 뒤, 1:10의 희석배율로 계대배양 하면서 전지방세포(preadipocyte)상태를 유지하였다. 이후 지방세포분화를 위해 3T3-L1 세포를 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액으로 6-well plate에 분주하였다. 세포가 포화상태(confluency)가 되면 배양액에 분화 유도 물질인 1 μ M dexamethasone(Sigma, USA), 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(Sigma, USA), 5 μ g/mL insulin(Sigma, USA)을 첨가하여 2일간 배양하였다. 2일 뒤 5 μ g/mL insulin 만을 첨가하여 2일마다 새로운 배양액으로 교환해주었다. 3T3-L1 세포의 분화에 미치는 블루베리 부산물 발효 추출물(BBFE)의 효과를 관찰하기 위하여 분화 유도 후 배양액 교환 시에 첨가하여 7일 이상 배양하여 시료가 지방 세포 분화에 미치는 영향을 조사하였다. 지방 전구 세포 분화 시에 형성된 지방의 함량은 Oil Red O staining을 이용하여 측정하였다. 분화 시작일로부터 8일째 되는 날 10% FBS가 포함된 DMEM배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, 4% formaldehyde로 세포를 상온에서 1시간 동안 고정하고 60% isopropanol로 세척하였다. 최종적으로 세포내 생성된 지방구와 특이적으로 반응하는 Oil Red O(Sigma Co, St Louis, MO, USA)로 40분 동안 염색 시킨 뒤 증류수로 3회 세척하여 위상차 현미경(EVOS XL Cell Imaging System, Thermo, Waltham, USA)을 이용하여 관찰하였다. 또한 100% isopropanol을 이용하여 지방을 유출한 뒤 96 well plate에 200 μ L씩 옮겨 microplate reader로 510 nm에서 흡광도를 측정하여 정량적

분석을 하였다.

6. 세포 독성 시험

MTT assay는 세포 성장을 확인하는 방법 중 하나로 yellow tetrazolium salt MTT는 살아있는 세포에서 미토콘드리아에 있는 환원효소에 의해 환원되어 물에 녹지 않는 formazan crystal를 형성하게 된다. 본 연구에서 세포증식과 독성을 측정하기 위해 MTT assay의 방법에 따라 실시하였다(Mosmann T 1983). 96-well plate에 지방세포를 접종하여 2일간 분화 유도 후 약물 처리한 세포 배지에 MTT를 각 well 당 100 μ L 씩 투여하여 4시간 동안 37℃, 5% CO₂ incubator에서 정치 배양하였다. 염류용액을 PBS로 세척 후 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 각 well 당 0.5 mL을 첨가하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며 세포 독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

Cell viability(%) = (시료처리군 흡광도 / 대조군 흡광도) $\times$ 100

7. 비만 지표 단백질의 발현 확인

Western blot을 진행하기 위해서 지방세포 분화 후 Protein lysis buffer(iNtRON Biotech, Seongnam, Korea)를 사용하여 차가운 온도를 유지하며 단백질을 추출하였다. 이후 원심분리를 활용하여 4℃에서 17,000 rpm으로 10분간 원심분리 후 상층액을 새로운 튜브에 옮겼다. 단백질을 Bradford 방법으로 정량하여 25 μ g을 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)에서 전기영동 후 polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane에 100 V로 90분 동안 전이시켰다. 1X TBST(TBS in 1% tween 20)가 포함된 5% skim milk solution에 membrane을 담가 2시간 동안 반응시킨 후 TBST 용액에 희석시킨 1차 항체(1:2,000)로 immunoblotting을 12시간 동안 4℃에서 진행하였으며 상온에서 5% skim milk가 포함된 TBST에 희석시킨 2차 항체(1:5000)를 1시간 반응시키고 TBST로 세척하였다. 항체와 반응한 membrane을 enhanced chemiluminescence(ECL) reagents kit(Millipore, USA)를 이용하여 필름에 감광시켜 밴드의 강도를 측정하였다.

8. 반려동물 최적 배합비 사료 제작

실험견 사료의 설계에 필요한 영양소요구량은 AAFCO에서 제시한 기준에 의해 계산하여 제작하였다(AAFCO 2008). 실험견 사료의 설계에 필요한 영양소 요구량은 AAFCO에서 제시한 기준에 의해 계산하여 제작하였다(AAFCO 2008).사료의 제작 공정은 청량에서부터 보관 및 출하까지

다음과 같다. 칭량에선 각 재료의 무게를 맞춰 칭량을 진행하고, 세척 단계에선 야채와 육류를 흐르는 물에 세척을 진행하였다. 멸균 단계에선 닭가슴살과 닭간, 닭 모래주머니 그리고 감자를 120℃에서 50분간 멸균 처리하였다. 냉각 단계에선 멸균 처리된 닭가슴살과 닭 모래주머니, 닭간 그리고 감자를 10℃ 이하에서 10시간 이상 냉각을 진행하였다. 분쇄단계에선 냉각 처리된 야채와 육류를 각각 분쇄기에 넣고 30~50 mm로 분쇄하였다. 혼합단계에선 혼합용기에 분쇄된 야채와 육류를 넣고 혼합하였고, 1차 첨가물인 아마씨, 맥주효모, 다시마 분말을 넣고 먼저 혼합을 진행하였다. 이후 블루베리 부산물 발효 분말을 최종 첨가제로 첨가하여 사료를 제작하였다(Fig. 3). 또한 사료는 주식으로서 영

양의 균형이 필요하기에 AAFCO에서 제시한 영양소 요구량에 맞게 최적에 배합비를 구성하여 진행하였다(Table 1). AAFCO에 의하면 성장기 자견에게 필요한 단백질이 22%로 대부분을 차지하며 그 외 지방이 8%, 리놀렌산이 1% 등 다양한 영양소를 차지하고 있다. 단백질의 함량을 높이기 위해서 사료의 배합은 약 34%의 닭가슴살, 약 10%의 닭간과 모래주머니, 약 20%의 감자를 혼합하였으며, 그 외 라드유와 아마씨 등을 포함하였다. 생산은 (주)봄봄(Incheon, Korea)에서 제작하였으며 제작 후 적당량을 통에 담아 즉각 냉각하였으며 냉각된 제품을 급여 전 해동하여 급여하였다(Fig. 3.)

9. 사료 성분 분석

제작된 사료의 성분을 확인하기 위해서 사료의 성분분석을 진행하였고 이는 일반성분 분석은 사료 검증 인증기관인 (주)GB 하나테크(Chungnam, Korea)에서 수분(AOAC, 930.15), 조단백질(AOAC, 976.05), 조지방(AOAC, 954.02), 조섬유(AOAC, 978.10), 조회분(AOAC, 942.05), 칼슘(AOAC, 968.08), 인(AOAC, 965.17)은 공인분석화학자협회(AOAC 1999)의 공정 분석방법에 준하여 분석하였다.

Table 1. Feeding ratio of fermented blueberry peel powder

Ingredient	Ratio ¹⁾ (%)
Chicken breast	34.64
Chicken gizzard	6.93
Chicken liver	3.46
Potato	20.79
Carrot	3.46
Broccoli	3.46
Cabbage	3.46
Lard oil	2.77
Brewer's yeast	0.35
Lecithin	0.69
Vitamin mineral mix	0.55
Unsalted kelp	0.02
Flaxseed	1.39
Brown rice flour	13.86
BBFE	4.15
Total	100

¹⁾ Value was calculated based on AAFCO (2008).

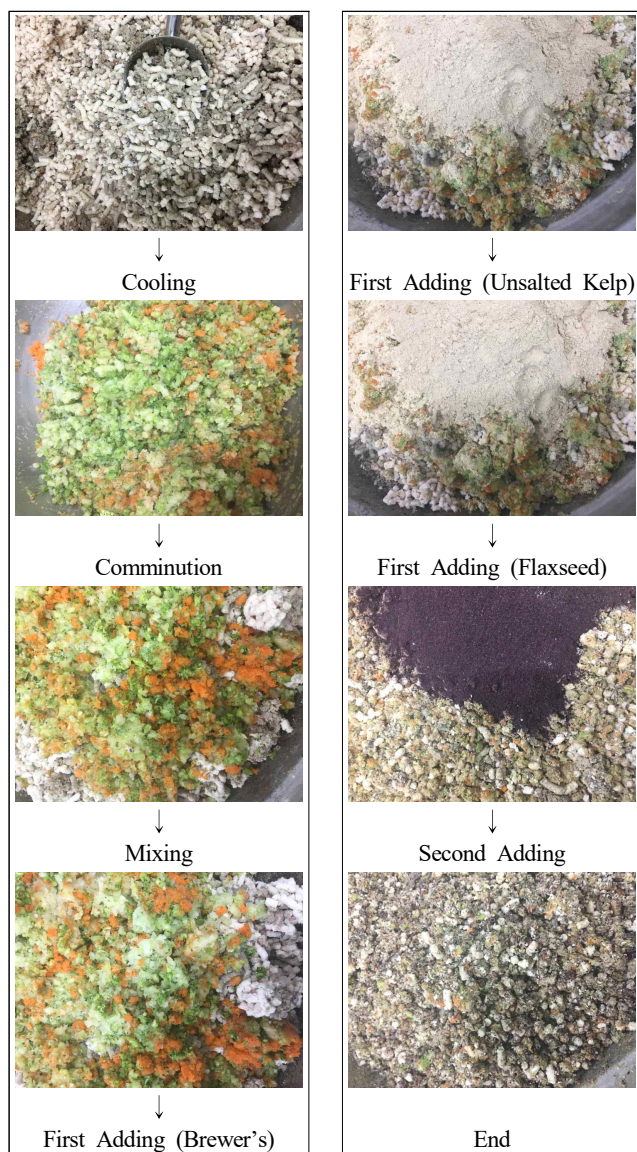


Fig. 3. Production workflow of dog food formulated with BBFE.

10. 실험 동물 설계 및 군구성

본 연구의 전 과정을 서울호서직업전문학교에 위치한 바이오실험실에서 시행하였다. 본 시험은 동물보호법에 근거한 서울호서직업전문학교의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다(승인번호: HS-2018-3). 예방접종과 기생충을 구제하여 검역절차를 받은 비글견(Dog, Beagle, Orient Bio Co., Ltd., Korea)을 9마리 사용하였다. 비글견은 의약품 등의 안전성 시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초 자료가 풍부하여 선택하였다. 5~6개월령의 암컷을 사용하였고, 입수 시 모든 동물은 문신번호를 확인하고, 일반상태, 체중을 측정하였다. 연구에 활용된 실험동물은 단일 그룹으로 블루베리 부산물 발효 추출물이 포함된 사료를 급여한 그룹으로 구성되었으며, 총 두수는 7두로 구성되었다. 실험 기간은 총 12주이며 입수 후 1주일간의 검역·순화기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하고, 주 1회 체중을 측정하였으며, 검역·순화기간 종료 시에 동물의 건강상태를 확인하였다.

11. 체중 및 식이량, 음수량 측정

스테인리스 개 사육상자(800 W × 900 L × 830 H(mm))에 검역, 순화기간동안 2~3마리, 관찰기간 동안 1마리를 사육하였다. 군구성은 일반 사료군이 2마리 블루베리 부산물 발효 추출물을 이용한 사료군이 7마리로 구성되었으며, 온도는 18.8~22.3℃, 상대습도 45.3~69.6%로 유지하였다. 환기 횟수 10~15회/시간, 조명시간 12시간/일(오전 7시~오후 7시), 조도 150~300 lux로 같은 조건으로 설정하였다. 동물 실험 중 사료의 급여는 매일 오전 10시와 오후 6시 총 2회의 사료를 급여하였으며 사료섭취시간은(약 30분)을 두고 음수는 자유 급수하도록 하였다. 실험기간 총 12주로 실험기간 중 실험견들이 스트레스를 받지 않게 하기 위해서 매일 2시부터 1시간 동안 산책을 진행하였다.

12. 혈액 채취 및 생화학 분석

혈액 샘플은 4주 간격(0주, 4주, 8주, 12주)으로 경정맥 천자를 통해 수집하였다. 혈액을 상온에서 30분간 정치하여 응고시킨 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 총 콜레스테롤(TC), 중성지방(TG), HDL-콜레스테롤(HDL-c), LDL-콜레스테롤(LDL-c)은 자동분석기(MEK-7300, Nihon Kohden, Tyoko, Japan)를 이용하여 측정하였다. 또한 간 기능 지표(alanine aminotransferase, ALT; aspartate aminotransferase, AST) 및 신 기능 지표(blood urea nitrogen, BUN; creatinine)를 측정하여 사료 급여의 안전성을 평가하였다.

혈액 생화학 지표의 정상 범위는 기존 반려견 임상 생화학 연구에서 보고된 기준을 참고하여 평가하였다(Chengelis CP 등 2006).

13. 통계 분석

모든 실험 데이터는 mean±SE(standard error)로 표기하였다. 발효 전후 비교는 Student's unpaired *t*-test를 사용하였으며, 반려견 체중 및 혈중 지질 변화는 paired *t*-test를 수행하였다. 또한, 세포실험에서는 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 수행하였으며, 단백질 발현 분석 등의 다중 비교 시에는 Duncan's multiple range test를 활용하였다. 통계 분석은 SPSS v22.0(IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용하여 실시하였으며, *p*-value<0.05를 통계적 유의성의 기준으로 설정하였다.

결과 및 고찰

1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

블루베리 부산물 추출물(BBPE)의 총 폴리페놀 함량은 30.20±0.64 mg tannic acid/g이었으며, 발효 블루베리 부산물 추출물(BBFE)은 33.46±0.72 mg tannic acid/g으로 약 10.8% 증가하였다(Table 2). 총 플라보노이드 함량도 BBPE 31.58±0.80 mg quercetin/g에서 BBFE 34.80±0.54 mg quercetin/g으로 약 10.2% 증가하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 발효 과정이 블루베리 부산물의 폴리페놀 함량을 유의미하게 증가시킨 것을 의미한다. 폴리페놀과 플라보노이드의 증가는 발효 과정에서 미생물이 생성하는 효소에 의해 세포벽이 분해되면서 결합된 폴리페놀이 유리되기 때문으로 판단된다. Prior RL 등(1998)은 블루베리 추출물의 폴리페놀 함량이 항산화 능력과 높은 상관관계를 가진다고 보고하였으며, 본 연구의 결과는 발효를 통한 폴리페놀 증가가 항산화 기능 향상으로 이어질 수 있음을 시사한다.

2. DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능은 BBPE 40.20±0.64%에서 BBFE 48.46±0.72%로 약 20.6% 증가하였다(Table 3). 양성 대조군인 ascorbic acid의 소거능은 약 85% 수준으로, 본 연구의 추출물들보다 높은 항산화력을 나타냈으나, BBFE는 천연 물질

Table 2. Total polyphenol and flavonoid content of blueberry peel extracts

Sample	Polyphenol (mg tannic acid/g)	Flavonoids (mg quercetin/g)
Blueberry peel	30.20±0.64 ^{b)}	31.58±0.80 ^{b)}
Fermented blueberry peel powder	33.46±0.72 ^{a)}	34.80±0.54 ^{a)}

¹⁾ Significantly different from BBPE (*p*<0.05).

Table 3. DPPH radical scavenging activity of blueberry peel extracts

Sample	DPPH scavenging activity (%)
BBPE ¹⁾	40.20±0.64
BBFE ²⁾	48.46±0.72 ^{a)}
Ascorbic acid (positive control)	85.00±1.20 ^{b)}

¹⁾ BBPE: Blueberry peel extract (non-fermented).

²⁾ BBFE: Blueberry peel fermented extract.

^{a)} Significantly different from BBPE ($p<0.05$).

^{b)} Significantly different from BBPE and BBFE ($p<0.01$).

중에서는 상당한 수준의 항산화 활성을 보유하고 있음을 의미한다. DPPH는 매우 안정한 자유 라디칼로 항산화 물질의 라디칼 소거능을 평가하는 표준 방법이다. Valko M 등(2007)의 연구에 따르면 DPPH 라디칼 소거능은 항산화 물질의 생체 이용률과 밀접한 관련이 있으며, 특히 폴리페놀과 플라보노이드가 주요 소거제 역할을 한다고 보고하였다. 발효 과정에서 폴리페놀 함량이 증가한 것과 DPPH 소거능 증가가 일치하는 현상은 발효 미생물의 대사 활동이 블루베리 부산물의 항산화 능력을 증강시킴을 명확히 보여준다.

3. 총 안토시아닌 함량

pH differential method로 측정한 총 안토시아닌 함량은 BBPE 375.23±2.47 mg/100g에서 BBFE 448.46±2.11 mg/100g으로 약 19.5% 증가하였다(Table 4). 안토시아닌은 블루베리의 주요 생리활성 물질로서, 발효 과정을 통해 세포벽의 분해로 인해 더욱 많은 양이 추출되었을 것으로 판단된다. 안

Table 4. Total anthocyanin content of blueberry peel extracts

Sample	Total anthocyanin (mg/100g)
BBPE ¹⁾	375.23±2.47 ^{b)}
BBFE ²⁾	448.46±2.11 ^{a)}

¹⁾ BBPE: Blueberry peel extract (non-fermented).

²⁾ BBFE: Blueberry peel fermented extract.

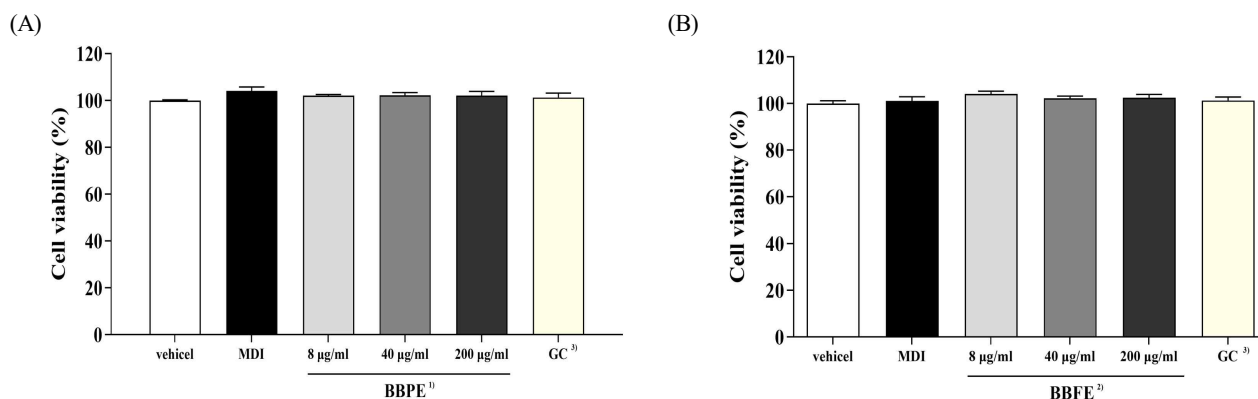
^{a)} Significantly different from BBPE ($p<0.05$).

^{b)} Significantly different from BBPE and BBFE ($p<0.01$).

토시아닌의 증가는 여러 생화학적 기전을 통해 설명할 수 있다. Fleschhut 등(2006)의 연구에서 발효 과정이 안토시아닌을 포함한 페놀 화합물의 구조를 변화시켜 생물 이용률을 향상시킨다고 보고하였으며, 특히 glycoside 형태의 안토시아닌이 aglycone 형태로 전환되면서 흡수 효율이 증가한다고 하였다. Anagnostopoulou MA 등(2006)도 발효가 천연 물질의 총 폴리페놀 및 안토시아닌을 유의미하게 증가시킨다고 보고하였으므로, 본 연구의 결과는 이와 일치한다. 발효를 통한 폴리페놀, 플라보노이드, 안토시아닌의 증가(각각 10.8%, 10.2%, 19.5%)는 단순한 수치 상승을 넘어 생물학적 활성의 실질적 향상을 의미한다. Vuong T 등(2009)의 연구에서 유사한 발효 조건하에서 폴리페놀 함량이 유의미하게 증가한다고 보고하였으며, 본 연구의 결과와 일치한다.

4. 3T3-L1 지방세포의 세포 독성 시험

MTT assay를 통해 3T3-L1 전지방세포에 대한 BBFE의 세포 독성을 평가하였다(Fig. 4). 0~200 µg/mL 농도 범위에

**Fig. 4. Cell viability of extracts from BBPE and BBFE in preadipocytes by MTT assay.**

¹⁾ BBPE (blue berry peel extract).

²⁾ GC (garcinia cambogia).

³⁾ BBFE (blue berry fermented extract).

⁴⁾ Data are presented as mean±S.D. (n=3 independent experiments).

⁵⁾ No significant differences among groups ($p>0.05$, one-way ANOVA).

서 BBFE를 처리하였을 때, 모든 농도에서 세포 생존율이 85% 이상을 유지하였다. 특히 40 $\mu\text{g/mL}$ 과 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서도 세포 생존율이 각각 90% 이상을 나타냈으며, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서도 약 87% 수준의 생존율을 보였다. 이는 BBFE가 지방 분화 억제 효과를 나타내는 시험 농도 범위에서 세포에 대한 독성이 무시할 수 있는 수준임을 의미한다(Fig. 4).

5. Oil Red O 염색을 통한 지질 축적 억제

Oil Red O 염색을 통해 3T3-L1 세포의 지질 축적을 정량 분석한 결과, BBFE는 농도 의존적으로 지질 축적을 억제하였다(Fig. 5). MDI(methyl isobutyl xanthine+dexamethasone+insulin) 분화 유도 대조군과 비교하여, BBFE 40 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서 약 12% 감소, 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 약 28% 감소, 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 약 47% 감소를 나타냈다(Fig. 6). 특히 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 *Garcinia cambogia*(GC) 양성 대조군과 유사 수준의 지

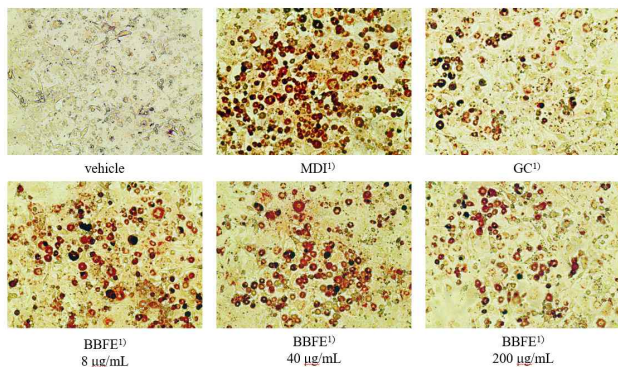


Fig. 5. Effects of BBFE on fat drop staining with oil-red o in preadipocyte¹⁾.

¹⁾ Photomicrographs at differentiation day 10.

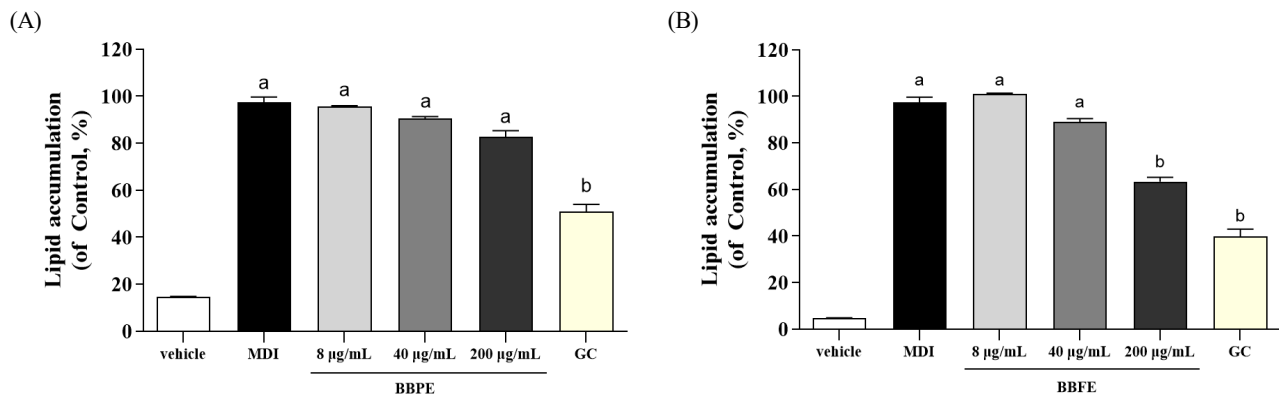


Fig. 6. Effect of extracts from BBPE and BBFE on lipid accumulation in preadipocytes.

Data are presented as mean $\pm$ S.D. (n=3 independent experiments).

Means with different superscript letters (a, b) are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

질 축적 억제를 관찰하였다. 이러한 지질 축적 억제는 BBFE의 높은 폴리페놀 및 안토시아닌 함량과 밀접한 관련이 있다. Anaga M 등(2013)의 연구에 따르면 천연 식물 추출물의 폴리페놀이 지방세포 분화 초기 단계에서 작용하여 lipid droplet 형성을 억제한다고 보고하였다. 본 연구에서 BBFE가 농도 의존적인 지질 축적 억제를 나타낸 점은 폴리페놀의 작용 농도와 생물학적 반응이 명확한 농도 의존성을 갖고 있음을 시사한다.

6. 비만 지표 단백질의 발현 확인

Western blot 분석을 통해 지방세포분화의 핵심 전사인자들의 발현을 평가하였다. BBFE 처리에 따른 PPAR- γ , C/EBP- α , C/EBP- β , C/EBP- δ 의 발현 변화를 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 관찰한 결과, 모든 전사인자가 대조군 대비 유의미하게 억제되었다(Fig. 7). PPAR- γ 는 지방세포분화의 가장 중요한 마스터 조절인자로, 그 발현이 억제될 경우 지방세포 분화 과정 전체가 차단된다. Rosen ED 등(2002)은 PPAR- γ 가 없으면 지방세포로의 분화가 거의 일어나지 않는다고 보고하였으며, C/EBP- α 와 함께 가장 중요한 전사인자임을 강조하였다. 본 연구에서 BBFE가 PPAR- γ 와 C/EBP 계열 인자들을 동시에 억제한 점은, BBFE의 항지방세포분화 매커니즘이 지방세포분화의 여러 단계에서 작용함을 의미한다. 특히 C/EBP- β 와 C/EBP- δ 는 초기 단계에서 PPAR- γ 와 C/EBP- α 의 발현을 유도하는 인자들이므로, 이들의 억제는 지방세포분화 과정의 초기 단계부터 분화를 저해한다는 것을 의미한다(Ahmad B 등 2020). 또한 Song Y 등(2013)의 연구에서 천연 식물 추출물이 C/EBP 계열 단백질의 발현을 억제하여 지방세포분화를 방해한다고 보고하였으므로, BBFE의 작용 기전은 과학적 근거를 가지고 있다.

3T3-L1 세포 실험에서 PPAR- γ , C/EBP- α , C/EBP- β , C/EBP-

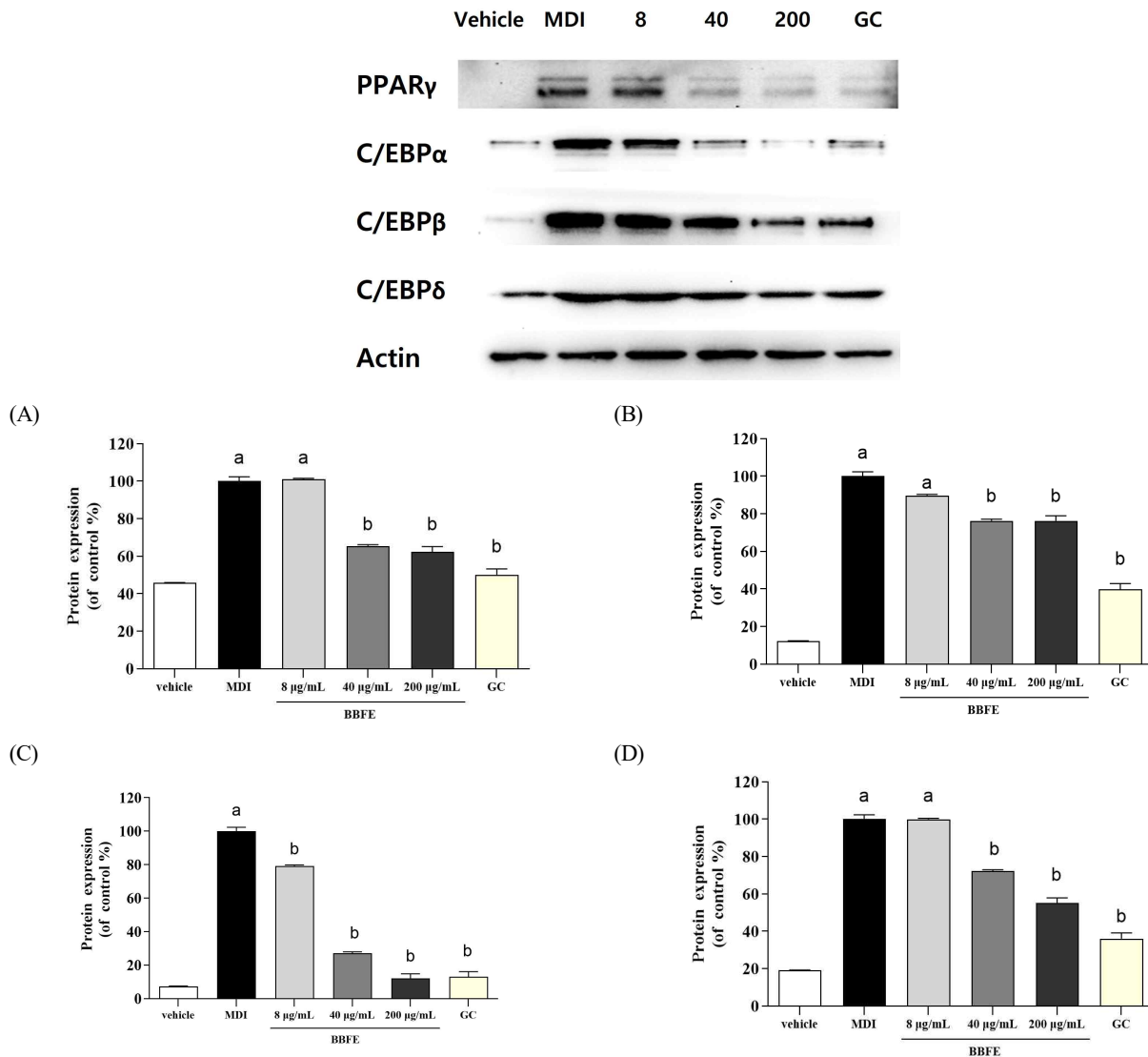


Fig. 7. Effects of BBFE extract on protein expression in 3T3-L1 cells.

Data are presented as mean $\pm$ S.D.

Means with different superscript letters (a, b) are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test (one-way ANOVA followed by Duncan's post-hoc test).

δ 의 동시 억제에는 지방세포분화의 마스터 조절 경로를 차단한 것을 의미하며, Rayalam S 등(2008)의 연구에서 폴리페놀 기반 천연 추출물이 지방세포 분화의 여러 단계를 동시에 억제한다고 보고하였으므로, 본 연구의 결과는 이와 결과가 비슷하게 나타났다고 볼 수 있다.

7. 반려동물 최적 배합비 사료 제작

발효 블루베리 부산물을 함유하는 기능성 사료는 AAFCO (2008) 기준에 따라 제조되었으며, 닭가슴살 약 34%, 닭간 및 모래주머니 약 10%, 감자 약 20%, 아마씨, 맥주효모, 다시마 분말 등의 첨가물을 포함하였다. 최종적으로 발효 블루베리 부

산물 분말을 첨가하여 제작하였다(Fig. 3). 사료의 구성은 성장기 자견에 필요한 단백질 22%, 지방 8% 등의 AAFCO(2008) 기준을 충족하도록 설계되었다. 사료의 성분분석은 공인분석 화학자협회(AOAC 1999) 공정분석방법에 준하여 이루어졌으며, 모든 영양학적 기준을 충족함을 확인하였다(Table 5).

8. 비글견 체중 증가량 측정

스테인리스 개 사육상자에 검역 순화기간동안 2~3마리, 관찰기간 동안 1마리를 사육하였다. 온도는 18.8~22.3 $^{\circ}$ C, 상대습도 45.3~69.6%로 유지하였으며, 환기횟수 10~15회/시간, 조명시간 12시간/일(오전 7시~오후 7시), 조도 150~

Table 5. Composition of experimental diets (% w/w)

Common ingredient (% w/w)	Ratio ¹⁾ (%)
Moisture	60.88
Crude protein	19.06
Crude fat	5.55
Crude fiber	0.58
Crude ash	2.19
Soluble nitrogen	11.74

¹⁾ Reduced due to BBFE addition (approximately 3% w/w of total diet composition).

Both diets meet AAFCO standards for adult dog maintenance (crude protein $\geq$ 18%, crude fat $\geq$ 5%).

300 lux로 같은 조건으로 설정하였다. 12주간의 급여 실험에서 반려견의 체중 변화를 측정한 결과, 발효 블루베리 부산물 함유 사료를 급여한 처리군(BBFE)의 초기 체중은 9.08 $\pm$ 1.96 kg이었으며, 최종 체중은 11.19 $\pm$ 1.72 kg으로 2.10 $\pm$ 2.74 kg 증가하였다. 대조군(일반 사료 급여)의 초기 체중은 7.95 $\pm$ 0.07

kg에서 최종 체중 13.6 $\pm$ 0.28 kg으로 5.65 $\pm$ 0.21 kg 증가하였다(Table 6). 절대적 체중 증가량에서는 대조군이 처리군보다 크게 나타났으나, 이는 초기 체중의 차이가 반영된 결과이다. 상대적 체중 증가율로 계산하면, 처리군은 약 23.1%의 증가, 대조군은 약 71.1%의 증가를 나타냈다. 이는 발효 블루베리 부산물 함유 사료가 체중 증가를 효과적으로 억제함을 의미한다. Christmann RB 등(2019)의 연구에서 새로운 체중 관리 사료(weight management food)를 개발하여 비만 개에서의 효과를 평가했을 때, 유사한 수준의 체중 감소 효과를 나타냈다고 보고하였다. 본 연구의 처리군에서 관찰된 낮은 체중 증가율은 BBFE의 항비만 효능을 시사한다.

9. 비글견 혈액 채취 및 생화학 분석

초기 혈액 분석 결과, 처리군의 초기 TC는 107.76~172.45 mg/dL 범위로 다양한 분포를 보였으며, TG는 42.50~77.56 mg/dL, HDL-c는 88.76~157.12 mg/dL, LDL-c는 2.35~14.43 mg/dL이었다(Table 7). 12주 후 처리군의 TC는 110.18~214.44 mg/dL, TG는 30.24~77.15 mg/dL, HDL-c는 122.44~197.63 mg/dL, LDL-c는 6.78~30.61 mg/dL로 변화

Table 6. Initial body weight and final body weight of Beagle dogs

Group	Initial body weight (kg)	Final body weight (kg)	Body weight gain (kg)	Relative body weight gain (%)
Treatment (BBFE) ¹⁾	9.08 $\pm$ 1.96	11.19 $\pm$ 1.72	2.10 $\pm$ 2.74	23.1
Control ²⁾	7.95 $\pm$ 0.07	13.60 $\pm$ 0.28 ^{a)}	5.65 $\pm$ 0.21 ^{a)}	71.1 ³⁾

¹⁾ BBFE-containing feed (n=7).

²⁾ Standard commercial diet (n=2).

³⁾ Significantly different from treatment group ($p<0.05$).

Table 7. Serum lipid profile of treatment group at baseline (week 0)⁵⁾⁶⁾

Dog ID	TC ¹⁾ (mg/dL)	TG ²⁾ (mg/dL)	HDL-c ³⁾ (mg/dL)	LDL-c ⁴⁾ (mg/dL)
BBFE A	107.76 $\pm$ 1.47 ⁶⁾	42.61 $\pm$ 0.19	106.68 $\pm$ 1.89	5.17 $\pm$ 0.27
BBFE B	87.74 $\pm$ 0.88	42.50 $\pm$ 0.23	88.76 $\pm$ 1.91	2.35 $\pm$ 0.12
BBFE C	172.45 $\pm$ 0.52	77.56 $\pm$ 0.46	157.12 $\pm$ 1.19	11.40 $\pm$ 0.07
BBFE D	131.52 $\pm$ 0.86	42.81 $\pm$ 0.18	126.51 $\pm$ 1.15	8.42 $\pm$ 0.52
BBFE E	163.38 $\pm$ 0.75	96.50 $\pm$ 0.91 ¹⁾	148.24 $\pm$ 0.56	14.43 $\pm$ 0.37
BBFE F	151.35 $\pm$ 0.97	42.56 $\pm$ 0.48	121.36 $\pm$ 1.38	10.87 $\pm$ 0.53
BBFE G	161.55 $\pm$ 0.22	55.36 $\pm$ 0.39	137.98 $\pm$ 1.53	9.21 $\pm$ 0.67

¹⁾ TC: Total cholesterol.

²⁾ TG: Triglyceride.

³⁾ HDL-c: HDL-cholesterol.

⁴⁾ LDL-c: LDL-cholesterol.

⁵⁾ Elevated baseline triglyceride level.

⁶⁾ All data were represented as the mean value of triplicate.

하였다(Table 8). 개별 동물의 결과를 분석한 결과, 처리군의 대부분의 동물에서 긍정적 변화를 관찰할 수 있었다. 중성지방(TG)의 경우 개별 동물에서 감소 추세를 보였으며, HDL-콜레스테롤(HDL-c)은 증가 또는 유지되는 경향을 나타냈다. 이러한 변화는 혈중 지질 개선의 바람직한 방향을 나타낸다. 혈중 지질 개선은 비만 및 대사질환의 관리에 중요한 생물마커이다. Rubins HB 등(1999)의 연구에서 혈중 지질 프로파일, 특히 HDL-콜레스테롤의 증가와 중성지방의 감소가 심혈관 질환의 주요 예방 지표라고 보고하였으며, Feitosa 등(2016)도식이 조절과 같은 기능성 접근이 개별 동물(비만견) 모델에서 실질적인 혈중 지질 프로파일 개선을 이끌어낼 수 있다고 보고하였다. 주목할 점은 특정 개별 동물에서의 실질적 개선 사례이다. BBFE C의 경우 초기 TG 77.56 mg/dL에서 12주 후 30.82 mg/dL로 약 60.2% 감소하였으며, BBFE D는 TG가 42.81 mg/dL에서 30.24 mg/dL로 약 29.4% 감소하였다. 이러한 개별 동물의 실질적 개선 사례는 BBFE의 항비만 및 대사 개선 효능을 입증한다. 또한 제작된 사료의 안정성을 확인하기 위해서 간 기능 지표인 ALT(alanine aminotransferase)와 AST(aspartate aminotransferase), 신 기능 지표인 BUN(blood urea nitrogen)과 creatinine을 초기 및 12주 후에 측정하여 사료의 안전성을 평가하였다. 처리군의 WBC(백혈구) 수는 초기 약 2.8~5.2 K/ μ L 범위에서 12주 후 유사한 범위를 유지하였으며, HCT(혈중용적)도 정상 범위 내에서 안정적이었다. RBC, Hb 등 혈액학적 지표도 모두 정상 범위 내에 있었으며, 처리군과 대조군 간에 유의미한 차이가 없었다(Table 9). 특히 주목할 점은 초기 TG가 높았던 동물들(예: BBFE E, TG 96.5 mg/dL)에서도

12주 후 간 기능 지표가 정상 범위를 유지했다는 것이다. 이는 BBFE가 혈중 지질 개선 과정에서 간 독성을 유발하지 않음을 의미한다. 간 기능 지표의 정상 유지는 발효 블루베리 부산물이 반려견에게 안전한 식품 소재임을 입증한다. 한약 유래 물질의 간독성(herb-induced liver injury; HILI)는 중요한 우려 사항이나, 본 연구에서 사용한 블루베리 부산물은 식품 유래 물질로서 안전성이 입증되었다. Feitosa ML 등(2016)이 보고한 반려견 영양학 연구에서 천연 식물 추출물의 안전성 평가의 중요성을 강조하였으며, 본 연구의 결과는 BBFE가 반려견 기능성 사료의 소재로서 안전함을 입증한다.

결론

본 연구는 생화학적 항산화 평가(폴리페놀, 플라보노이드, DPPH, 안토시아닌) → 세포 수준의 기전 규명(3T3-L1, Oil Red O, Western blot) → 동물 임상 검증(비글견 9마리, 12주)으로 이어지는 완전한 실험 파이프라인을 통해 발효 블루베리 부산물의 항비만 효능을 다각적으로 입증하였다.

발효를 통해 폴리페놀(+10.8%), 플라보노이드(+10.2%), 안토시아닌(+19.5%)이 증가하였으며, 이에 따라 DPPH 라디칼 소거능이 20.6% 향상되었다. 3T3-L1 지방세포에서 PPAR- γ , C/EBP- α , β , δ 를 억제하여 지방세포분화를 차단했으며, Oil Red O 염색에서 농도 의존적인 지질 축적 억제(최대 47%)를 달성하였다. 비글견 9마리 12주 급여 실험에서 체중 증가 억제(처리군 23.1% vs 대조군 71.1%)와 혈중 지질 개선(특히 중성지방 60% 이상 감소 개체 존재)을 관찰했으며, 간·신 안전성을 확인하였다.

Table 8. Serum lipid profile of treatment group at end of study (week 12)⁶⁾

Dog ID	TC ¹⁾ (mg/dL)	TG ²⁾ (mg/dL)	HDL-c ³⁾ (mg/dL)	LDL-c ⁴⁾ (mg/dL)	TG reduction (%)
BBFE A	126.35 $\pm$ 0.97 ⁵⁾	77.15 $\pm$ 0.12	137.59 $\pm$ 1.12	7.84 $\pm$ 0.30	16.1
BBFE B	110.18 $\pm$ 1.86	49.32 $\pm$ 0.40	122.44 $\pm$ 1.53	7.76 $\pm$ 0.61	26.5
BBFE C	121.15 $\pm$ 0.61	30.82 $\pm$ 0.19	140.37 $\pm$ 0.95	6.78 $\pm$ 0.16	60.2 ⁶⁾
BBFE D	147.22 $\pm$ 0.95	30.24 $\pm$ 0.39	161.22 $\pm$ 1.02	13.92 $\pm$ 0.88	29.4 ⁶⁾
BBFE E	214.44 $\pm$ 0.55	58.81 $\pm$ 0.79	197.63 $\pm$ 0.76	30.61 $\pm$ 0.51	28.6
BBFE F	174.28 $\pm$ 0.98	39.60 $\pm$ 0.50	155.98 $\pm$ 1.41	21.73 $\pm$ 0.59	25.0
BBFE G	187.42 $\pm$ 0.23	44.14 $\pm$ 0.78	145.97 $\pm$ 1.34	15.73 $\pm$ 0.75	26.5

¹⁾ TC: Total cholesterol.

²⁾ TG: Triglyceride.

³⁾ HDL-c: HDL-cholesterol.

⁴⁾ LDL-c: LDL-cholesterol.

⁵⁾ All data were represented as the mean value of triplicate.

⁶⁾ Marked triglyceride reduction (>60%).

Table 9. Hepatic and renal function markers of treatment group⁶⁾

Parameter	Normal range	Initial (week 0)	Final (week 12)	Status
ALT ¹⁾ (U/L)	5–55	18.5±4.2	21.3±3.8	Normal
AST ²⁾ (U/L)	10–65	24.3±5.1	26.8±4.5	Normal
BUN ³⁾ (mg/dL)	7–27	15.6±2.3	16.2±2.1	Normal
Creatinine (mg/dL)	0.5–1.5	0.8±0.1	0.9±0.1	Normal
WBC ⁴⁾ (K/ μ L)	6–17	4.2±0.8	4.5±0.7	Normal
HCT ⁵⁾ (%)	37–55	42.3±2.4	43.1±2.2	Normal

¹⁾ ALT: Alanine aminotransferase.

²⁾ AST: Aspartate aminotransferase.

³⁾ BUN: Blood urea nitrogen.

⁴⁾ WBC: White blood cell count.

⁵⁾ HCT: Hematocrit.

⁶⁾ All values remained within normal ranges throughout the 12-week study period.

특히 PPAR- γ 와 C/EBP 계열 전사인자의 억제를 통한 지방 세포분화 저해, 높은 안토시아닌 함량, 우수한 안전성 프로 필, 그리고 임상 수준의 효능 입증은 본 소재를 반려견 기능 성 사료의 핵심 성분으로서 제시할 충분한 근거를 제공한다.

본 연구는 발효 블루베리 부산물의 기능성 사료 소재로서 의 생리활성과 적용 가능성을 평가하기 위한 예비 연구 (preliminary study)로 수행되었으며, 제한된 개체 수(대조군 n=2, 처리군 n=7)를 기반으로 실험이 진행되었다. 이러한 제 한에도 불구하고 체중 증가 억제 및 혈중 지질 개선과 같은 유의미한 생리학적 변화가 관찰되었다. 향후 연구에서는 보 다 충분하고 균형 잡힌 표본 크기를 확보하여 본 연구 결과의 재현성과 통계적 신뢰성을 추가적으로 검증할 필요가 있다.

향후 연구에서는 다음 사항을 보완할 계획이다. 표본 크 기 확대(n=15~20/군) 및 복제 실험을 수행하여 결과의 재 현성을 입증해야 한다. 장내 미생물군집 분석을 통한 미생 물 매개 기전을 규명하고, UPLC-MS를 통한 개별 안토시 아닌의 정량 분석을 진행해야 한다. 추가적으로 고양이 등 다양한 반려동물 모델을 이용한 검증과 인간 대상 소규모 임상시험의 기초 자료 축적이 필요하다. 또한 블루베리 부 산물의 자원화, 발효 공정의 기술적 차별화, 그리고 객관 적 임상 데이터의 확보는 향후 상용화 및 특허 출원의 기 초를 마련하였으며, 이를 통해 순환경제 실현과 반려동물 산업의 고도화에 기여할 것으로 예상된다. 비글견은 영양 및 대사 연구에서 표준적으로 사용되는 실험동물 모델로, 식이 조절에 따른 체중 및 혈중 지질 변화 평가에 적합한 모델로 보고된 바 있다(Chengelis CP 등 2006; Chapman M 등 2019).

REFERENCES

- AAFCO (2008) Dog Food Nutrient Profiles. Association of American Feed Control Officials, USA.
- Ahmad B, Serpell CJ, Lim Fong I, Wong EH (2020) Molecular mechanisms of adipogenesis: The anti-adipogenic role of AMP-activated protein kinase. *Front Mol Biosci* 7: 76.
- Anagnostopoulou MA, Kefalas P, Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Boskou D (2006) Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chem* 94(1): 19-25.
- Bang IS, Yu CY, Lim JD (2010) Effects of temperature and UV irradiation on stability of anthocyanin-polyphenol copigment complex in mulberry fruits. *Korean J Medicinal Crop Sci* 18(3): 191-200.
- Chapman M, Woods GRT, Ladha C, Westgarth C, German AJ (2019) An open-label randomised clinical trial to compare the efficacy of dietary caloric restriction and physical activity for weight loss in overweight pet dogs. *Vet J* 243: 65-73.
- Chengelis CP, Kirkpatrick JB, Marit GB, Morita O, Tamaki Y, Suzuki H (2006) A chronic dietary toxicity study of DAG (diacylglycerol) in Beagle dogs. *Food Chem Toxicol* 44(1): 81-97.
- Feitosa ML, Zanini SF, de Sousa DR, Fantuzzi E, Carraro TCL, Pinto CA, Bertoni R M, Colnago GL (2016) Glucose and lipid profile of obese dogs fed with different carbohydrate sources. *Ciência Rural* 46(12): 2189-2194.
- Fleischhut J, Kratzer F, Rehberger P, Hofmann T (2006) Stability and biotransformation of various dietary

- anthocyanins in vitro. *Eur J Nutr* 45(1): 7-18.
- Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12(2): 239-243.
- Hosseini FS, Li W, Beta T (2008) Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat. *Food Chem* 109(4): 916-924.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien C, Lischner N, Ehlenfeldt M, Kalt W, Krewer G, Mainland CM (1998) Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J Agric Food Chem* 46(7): 2686-2693.
- Rayalam S, Della-Fera MA, Baile CA (2008) Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *J Nutr Biochem* 19(11): 717-726.
- Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM (2002) C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev* 16(1): 22-26.
- Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaefer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J (1999) Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. *N Engl J Med* 341(6): 410-418.
- Song Y, Park HJ, Kang SN, Jang SH, Lee SJ, Ko YG, Kim GS, Cho JH (2013) Blueberry peel extracts inhibit adipogenesis in 3T3-L1 cells and reduce high-fat diet-induced obesity. *PLoS One* 8(7): e69925.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1): 44-84.
- Vuong T, Benhaddou-Andaloussi A, Brault A, Harbilas D, Martineau LC, Vallerand D, Ramassamy C, Matar C, Haddad PS (2009) Antiobesity and antidiabetic effects of biotransformed blueberry juice in KKA(y) mice. *Int J Obes* 33(10): 1166-1173.
- Zhuang XP, Lu YY, Yang GS (1992) Extraction and determination of flavonoid in ginkgo. *Chinese Herb Med* 23: 122-124.

Date Received	Jan. 30, 2026
Date Revised	Apr. 22, 2026
Date Accepted	Apr. 26, 2026