

블루베리발효액이 식이유도 비만 Mice의 비만에 미치는 효과*

전종희¹ · 김보경² · 문은경² · 차연수² · 유옥경^{3†}

전북대학교 라이프스타일학과¹, 전북대학교 식품영양학과², 전북대학교 부설 비만연구센터³

Effects of fermented blueberry liquid in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice*

Jeon, Jong-Hee¹ · Kim, Bohkyung² · Mun, Eun-Gyung² · Cha, Youn-Soo² · Yu, Ok-Kyeong^{3†}

¹Department of Lifestyle-Medicine, Chonbuk National University, Iksan 54596, Korea

²Department of Food Science and Human Nutrition, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

³Department of Obesity Research Center, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

ABSTRACT

Purpose: The objective of the present study was to determine whether fermentation can increase the protective effects of blueberry liquid in a high-fat diet-induced obese mice model. **Methods:** Male C57BL/6J mice were fed a high-fat diet (HD, 60% fat, w/w), HD supplemented with 10 ml/kg BW/day of blueberry liquid (BHD, blueberry high-fat diet), or HD supplemented with 10 ml/kg BW/day of fermented blueberry liquid (FBHD, fermented blueberry high-fat diet) for 10 weeks. **Results:** There were significant decreases in the body, epididymal adipose tissue, and liver weights of blueberry-fed groups compared to HD, whereas there were no significant differences in food intake among the groups. Furthermore, blueberry liquid groups, especially fermented blueberry liquid, significantly attenuated the contents of hepatic triglycerides and total cholesterol induced by HD. Serum LDL-cholesterol was significantly lower in the BHD and FBHD-fed groups, whereas FBHD significantly increased the serum HDL-cholesterol level compared to the control. Concentrations of aspartate transaminase, alanine transaminase, and leptins in serum were also reduced by blueberry liquid supplementation. The mRNA expression of hepatic acetyl CoA carboxylase was significantly reduced in both the BHD and FBHD groups compared to HD. Furthermore, FBHD altered the mRNA expression level of hepatic lipolysis genes. **Conclusion:** In conclusion, these results suggest that blueberry, especially fermented blueberry liquid, may improve obesity-related abnormalities.

KEY WORDS: high-fat diet, fermented blueberry liquid, anti-obesity, C57BL/6J

서 론

식생활의 서구화와 함께 신체적 활동량이 줄어들고 여러 나라에서 비만이 사회적 문제인 것처럼 우리나라에서도 점점 비만 인구가 증가하고 있는데, 국민건강영양조사에 따르면 비만유병률은 우리나라의 19세 이상 성인은 1998년에는 25.8%, 2012년에는 32.8%로 증가하였다.¹ 비만은 고혈압, 제 2형 당뇨병, 관상동맥 질환 등 다양한 만성질환을 일으키며 그에 따른 의료비용이 늘어나고 있는데, 건강 손실의 요인이 되었던 흡연, 음주, 빈곤보다도 많은 지출이 발생되고 있다.²

따라서 건강한 삶을 살기 위해 자연 식품이나 맛과 영양성을 동시에 충족 할 수 있는 기능성 식품에 대한 관심이 커지고 있다. 발효는 원료에 당 또는 효모, 유산균 등의 미생물 첨가를 통하여 진행되는데, 이때 원재료가 가지고 있는 여러 효소들이 활성화되면서 다양한 기능성 성분들이 생산되며, 원재료가 가지고 있는 영양 성분들이 소화, 흡수되기 좋은 형태로 변환된다.³ 감귤 진피 추출물을 이용한 발효액 제조 및 *Campylobacter jejuni*에 대한 항균 활성,⁴ 연근의 성분분석 및 연근 발효음료의 기능성 평가⁵ 등과 같이 다양한 천연 식재료의 발효와 이를 통한 건강에 유익한 기능성 식품의 개발을 위해 많은 연구가 이루어지고

Received: August 1, 2017 / Revised: August 17, 2017 / Accepted: September 21, 2017

* This research was financially supported by the Ministry of Trade, Industry, and Energy (MOTIE), Korea, under the "Regional Specialized Industry Development Program"(reference number R16030021210) supervised by the Korea Institute for Advancement of Technology (KIAT).

† To whom correspondence should be addressed.
tel: +82-63-270-4672, e-mail: okokyu@jbnu.ac.kr

© 2017 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

있다.

그 중 블루베리는 진달래과 (*Ericaceae*) 산앵도나무속 (*Vaccinium*) 작물로 북아메리카 원산지이며 수관크기에 따라 하이부시 블루베리 (high bush blueberry, *V. corymbosum*) 와 로우부시 블루베리 (low bush blueberry, *V. angustifolium*) 로 분류되며 상업적으로 중요한 과실로 재배되고 있다.⁶ 최근 국내에서도 블루베리 관련 다양한 연구가 진행되면서⁷ 여러 음식에 활용 되고 있다. 특히 블루베리를 이용한 발효액에 관한 연구도 많이 진행되고 있는데, 블루베리 유산균 발효물의 이화학적 특성 및 저장 안정성,⁸ 토종효모를 이용한 블루베리 발효주의 발효 특성 및 항산화 활성,⁹ 블루베리 천연 발효액종을 첨가한 우리밀 식빵의 품질 특성¹⁰ 등이 있다. 그러나 대부분 블루베리발효액을 활용하기 위한 개발이며, 생체 내 효능 검증을 위해 동물실험을 통한 블루베리발효액의 생리활성 연구는 미흡한 실정으로 많은 연구가 필요하다. 따라서 본 연구는 고지방식으로 비만이 유도된 C57BL/6J mice에 블루베리액의 섭취에 따른 항비만 효능을 평가하며, 특히 블루베리의 발효에 따른 효능을 검증하였다.

연구방법

실험재료

블루베리액 및 발효액의 제조방법은 냉동 블루베리 300 g, 탈지분유 60 g, arginine 10 g, 증류수 1,200 ml을 2 L의 병에 담은 후, autoclave에 넣고 121°C에서 15분간 멸균하고 clean bench에서 상온까지 방열하였다. 블루베리발효액 제조를 위해 SC-5 starter 1 g을 첨가하고 배양기에서 30°C로 2일간 발효하였다. 시중에서 파는 고운 체로 액상과 고형물을 분리하여 액상을 시료로 사용하였다.

실험동물의 사육 및 실험설계

블루베리액 및 발효액의 항비만 효과를 알아보기 위해 생후 4주된 수컷 생쥐인, C57BL/6J mice를 중앙실험동물 (Central Lab. Animal Inc, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 고형식이 (Research Diets, New Brunswick, NJ, USA)를 1주일 동안 급여하여 환경에 적응시킨 후, 난괴법 (randomized block design)에 의해 7마리씩 총 3개의 군으로 나누고 10주 동안 사육하였다. 실험식이디자인은 Table 1과 같으며, 고지방식이대조군 (HD)은 고지방식이 (60% fat diet) + 증류수 (10 ml/kg BW/day), 블루베리액군 (BHD)은 고지방식이 (60% fat diet) + 블루베리액 (10 ml/kg BW/day), 블루베리발효액군 (FBHD)은 고지방식이 (60% fat diet) + 블루베리발효액 (10 ml/kg BW/day)을 각

Table 1. Composition of experimental diet

	High-fat diet		Normal diet	
	100 g	kcal/100 g	100 g	kcal/100 g
Casein	25.91	103.64	18.96	75.83
Cystine	0.39	1.55	0.28	1.14
Corn starch	0.41	1.65	29.86	119.43
Maltodextrin	16.15	64.61	3.32	13.27
Sucrose	8.89	35.56	33.17	132.70
Cellulose	6.46	0.00	4.74	0.00
Soybean oil	3.23	29.08	2.37	21.33
Lard	31.68	285.12	1.90	17.06
Mineral	1.29	0.00	0.95	0.00
Dicalcium phosphate	1.68	0.00	1.23	0.00
Calcium carbonate	0.71	0.00	0.52	0.00
Potassium citrate	2.13	0.00	1.56	0.00
Vitamin mix	1.29	5.17	0.95	3.79
Choline bitartrate	0.26	0.00	0.19	0.00
Dye	0.01	0.00	0.00	0.00
Total	100.50	526.38	100.00	384.53

BHD, high-fat diet plus 10 ml/kg BW/day of non-fermented blueberry liquid by oral administration; FBHD, high-fat diet plus 10 ml/kg BW/day of fermented blueberry liquid by oral administration

각 경구투여로 공급하였다. 실험동물의 체중은 사육기간 동안 1주일에 한 번씩 측정하고 물과 식이 (Table 1)는 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 식이효율 (food efficiency ratio, FER)은 식 FER (%) = (Total weight gain / Total food intake) × 100으로 산출하였다. 사육실의 온도는 22 ~ 24°C, 습도는 50 ~ 60%로 유지하였으며 명암은 12시간 주기 (07:00 ~ 19:00)로 조절하여 관리하였다. 본 실험은 전북대학교 실험동물 윤리위원회의 승인을 얻어 실시하였다 (CBNU 2016-108).

혈액 및 장기 채취

사육을 끝낸 실험동물을 12시간 절식시킨 후 희생시켰으며, 혈액은 1,100 × g, 4°C에서 15분간 원심분리한 후 혈청을 분리하고 분석 전까지 -80°C에서 보관하였다. 간 및 부고환지방 또한 채혈 후 즉시 적출하여 무게를 측정하고 -80°C에서 보관 하였다.

지질성분 함량 측정

혈중의 중성지방 (triglyceride, TG) 및 총 콜레스테롤 (total cholesterol, TC)은 시판되는 kit (Asan Pharmaceutical Co., Seoul, Korea)를 사용하여 효소법으로 측정하였으며, HDL-콜레스테롤은 phosphotungstic acid-Mg²⁺침전법으로, LDL-콜레스테롤 및 VLDL-콜레스테롤은 Friedwald 방법을¹¹ 이용하여 계산하였다. 간 지질함량은 Folch방법¹²을 통해 추출한 후 간 조직 중의 총 콜레스테롤 및 중성지방은

시판되는 kit (Asan Phamaceutical Co., Seoul, Korea)로 측정하여 간 조직의 지질 성상을 확인하였다.

혈액 생화학적 분석

지방조직에서 분비되는 혈중 렙틴, 아디포넥틴 등 아디포카인의 수준은 시판 ELISA kit (Quantikine & immunoassay kit, R&D System, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 분석하였다. 혈청 내 alanine aminotransferase (ALT)와 aspartate aminotransferase (AST)의 활성은 시판되는 kit (Asan Phamaceutical Co., Seoul, Korea)를 이용해 측정하였다.

Table 2. Primer sequences for quantitative real-time PCR

Gene name	Primers	Sequence (5'-3')
PPAR γ	Forward	GTGCCAGTTTCGATCCGATAGA
	Reverse	GGCCAGCA TCGGTAGATGA
C/EBP α	Forward	GTGTGCACGTCATGCTAAACCA
	Reverse	GCCGTTAGTGAAG AGTCTCAGTTT
FAS	Forward	AGGGGTGCACCTGGTCTCA
	Reverse	GCCATGCCCAGAGGGTGGTT
ACC	Forward	CCAACATGAGGACTATAACTTCCT
	Reverse	TACATACGTGCCGTCAGGCTTCAC
SREBP-1c	Forward	GATCAAAGAGGAGCCAGTGC
	Reverse	TAGATGGTGGCTGCTGAGTG
PPAR α	Forward	CCTGAACATCGAGTGTGGAATAT
	Reverse	GGTCTCTCTGAATCTTGCAGCT
ACOX	Forward	CCCAACTGTGACTTCCATT
	Reverse	GGCATGTAACCCGATGCACT
CPT1 α	Forward	AAAGATCAATCGGACCCTAGACA
	Reverse	CAGCGAGTAGCGCATAGTCA
ATGL	Forward	AACACCAGCATCCAGTTCAA
	Reverse	GGTCA GTAGGCCATTCCCTC
HSL	Forward	ACCGAGACAGGCCTCAGTGTG
	Reverse	GAATCGGCCACCGGTAAGAG
β -actin	Forward	AGCCTCTCTCTGGGTATGG
	Reverse	CACTTGCCGTCACGATGGAG

ACC, acetyl-CoA carboxylase; ACOX, acyl-coA oxidase; ATGL, adipose triglyceride lipase; C/EBP α , CCAAT-enhancer-binding protein-alpha; CPT-1 α , carnitine palmitoyltransferase-1-alpha; FAS, fatty acid synthase; HSL, hormone sensitive lipase; PPAR- γ , peroxisome proliferator-activator receptor-gamma; PPAR- α , peroxisome proliferator-activator receptor-alpha; SREBP-1c, sterol regulatory element-binding transcription factor 1c

Table 3. Body weight and food intake of C57BL/6J mice fed a high-fat diet for 10 weeks

Group ¹⁾	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio (%) ⁴⁾
HD	19.37 \pm 0.45	37.92 \pm 2.2 ^{a3)}	0.27 \pm 0.034 ^a	2.33 \pm 0.06 ²⁾	11.39 \pm 1.32 ^a
BHD	19.39 \pm 0.61	34.69 \pm 3.85 ^b	0.22 \pm 0.062 ^{ab}	2.31 \pm 0.07	9.48 \pm 2.77 ^{ab}
FBHD	18.81 \pm 0.6	33.34 \pm 2.05 ^b	0.21 \pm 0.027 ^b	2.31 \pm 0.11	8.98 \pm 1.08 ^b

1) HD, high-fat diet control containing 60 kcal% fat; BHD, high-fat diet plus 10 ml/kg BW/day of non-fermented blueberry liquid by oral administration; FBHD, high-fat diet plus 10 ml/kg BW/day of fermented blueberry liquid by oral administration 2) Mean \pm SD of 7 mice per group 3) Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). 4) Food efficiency ratio (%) = [Total weight gain / Total food intake] \times 100

간 지방대사 관련 유전자 발현 측정

Total mRNA 추출은 trizol reagent을 사용해 추출하고, cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 유전자 발현은 각 유전자의 primer와 SYBR Green Master mix (TOYOBO Co., LTD. Osaka, Japan)를 이용하고, 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 통해 측정하였다. 본 실험에서 이용한 PCR primer는 Table 2와 같다.

통계처리

실험 결과는 SPSS 23 통계프로그램 (IBM inc., Amonk, NY, USA)을 사용하여 평균 (mean) \pm 표준편차 (standard deviation, SD)로 나타내었고, 각 군 간의 통계적 유의성 검증은 ANOVA분석을 하였다. 각 군들 사이에 유의한 차이가 있는 경우, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하여 검증하였다.

결 과

체중변화 및 간 지질수준

식이섭취량은 세 군 사이에 유의적으로 차이가 없었으며, 체중은 고지방식이 대조군 (HD)에 비해 블루베리액군 (BHD)과 블루베리발효액군 (FBHD)이 각각 10%, 11%로 유의적으로 감소하였다. 그리고 식이효율 (FER)은 HD군

Table 4. Tissue weights and liver lipid levels of C57BL/6J mice fed a high-fat diet for 10 weeks

Group ¹⁾	Epididymal fat (g)	Liver		
		weight (g)	TG ²⁾ (mg/g)	TC ³⁾ (mg/g)
HD	2.36 \pm 0.28 ^a	1.04 \pm 0.075 ^a	11.96 \pm 1.03 ^a	8.87 \pm 0.69 ^a
BHD	2.01 \pm 0.34 ^b	0.95 \pm 0.058 ^b	10.19 \pm 0.86 ^b	7.34 \pm 0.5 ^b
FBHD	2.00 \pm 0.29 ^b	0.89 \pm 0.085 ^b	9.83 \pm 1.86 ^b	6.18 \pm 1.28 ^c

1) HD, high-fat diet control containing 60 kcal% fat; BHD, high-fat diet plus 10 ml/kg BW/day of non-fermented blueberry liquid by oral administration; FBHD, high-fat diet plus 10 ml/kg BW/day of fermented blueberry liquid by oral administration 2) Triglyceride 3) Total cholesterol 4) Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

에 비해 BHD군은 감소경향을 보였으며, FBHD군은 유의적으로 감소하였다 (Table 3). 부고환지방과 간의 무게 측정 결과, BHD군과 FBHD군은 HD군에 비해 유의적으로 낮아졌다 (Table 4). 간의 중성지방과 총 콜레스테롤은 HD군과 비교 시 BHD군과 FBHD군이 유의적으로 감소하였으며, 특히 총 콜레스테롤에서 FBHD군이 BHD군에 비해 유의적으로 낮아진 수치를 보였다.

혈중 지질수준 및 효소활성

혈중 지질 수준 수치를 측정해 본 결과 (Fig. 1a), 총 콜레스테롤 수치에서는 모든 군 간에 유의적인 차이를 보이

지 않았으나, 콜레스테롤 구성에 변화를 나타내었다. LDL-콜레스테롤은 HD군에 비해 BHD군과 FBHD군이 유의적으로 감소하였고, HDL-콜레스테롤은 HD군에 비해 FBHD군은 39.4%, BHD군은 19.8% 유의적으로 증가하였다. 혈중 중성지방과 VLDL-콜레스테롤은 HD군보다 FBHD군에서 증가하였다. 알코올 및 고지방식이 등에 의한 손상이 발생 시 혈액 중으로 방출되어 증가하여 간 질환 지표로 사용되고 있는 AST 및 ALT의 측정된 결과, FBHD군의 혈중 AST 및 ALT 활성이 HD군에 비해 유의적으로 감소하였다 (Fig. 1b). 비만에 의해 변화하는 것으로 알려진 렙틴 및 아디포넥틴 농도를 측정된 결과, 렙틴 농도는 HD군

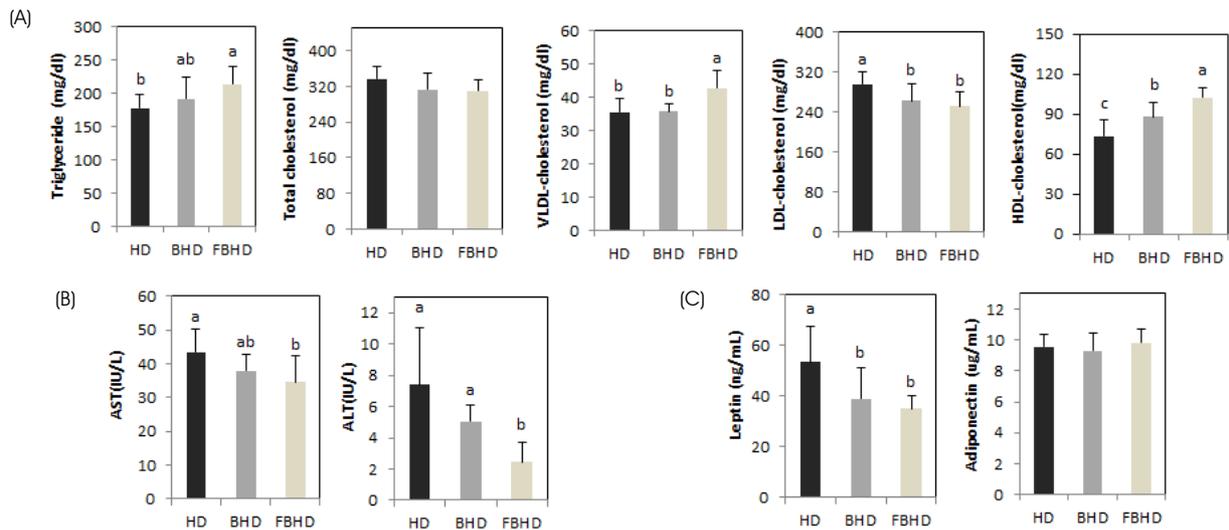


Fig. 1. Serum chemistry of C57BL/6J mice fed a high-fat diet for 10 weeks (a) lipid content, (b) aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), (c) leptin and adiponectin levels. Data are expressed as mean ± SD of 7 mice per group. Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). HD, high-fat diet; BHD, high-fat diet plus 10 ml/kg BW/day of non-fermented blueberry liquid; FBHD, high-fat diet plus 10 ml/kg BW/day of fermented blueberry liquid

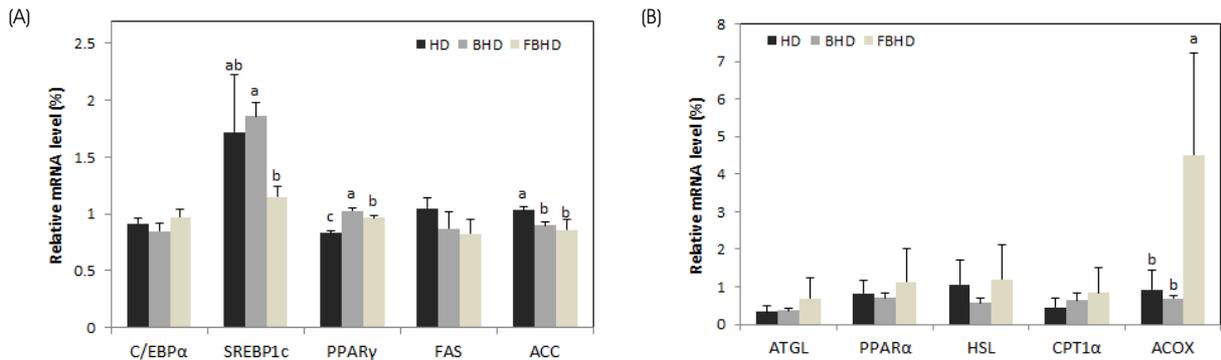


Fig. 2. Hepatic gene expressions in C57BL/6J mice fed a high-fat diet for 10 weeks (a) lipogenic gene expression, (b) lipolysis-associated gene expression. Data are expressed as mean ± SD of 7 mice per group. Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). HD, high-fat diet; BHD, high-fat diet plus 10 ml/kg BW/day of non-fermented blueberry liquid; FBHD, high-fat diet plus 10 ml/kg BW/day of fermented blueberry liquid. PPARγ, peroxisome proliferator-activator receptor-gamma; C/EBPα, CCAAT-enhancer-binding protein-alpha; SREBP-1c, Sterol regulatory element-binding transcription factor 1c; FAS, fatty acid synthase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; ATGL, adipose triglyceride lipase; HSL, hormone sensitive lipase; CPT1α, carnitine palmitoyltransferase-1-alpha; ACOX, acyl-CoA oxidase; PPARα peroxisome proliferator-activator receptor-alpha

에 비해 BHD군과 FBHD군이 유의적으로 감소하였고, 아디포넥틴 농도는 유의적 차이는 없지만 FBHD군에서 증가 경향을 보였다 (Fig. 1c).

mRNA 유전자 발현 분석

블루베리액 및 발효액의 혈중 콜레스테롤 및 간지질 성상 변화 효과의 조절 메커니즘을 살펴보기 위해, 지질대사 관련 유전자들 변화를 qRT-PCR을 이용해 분석하였다 (Fig. 2). 지질 합성 관련 전사인자로 peroxisome proliferator-activator receptor-gamma (PPAR γ), CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBP α), sterol regulatory element-binding transcription factor 1c (SREBP-1c), 표적 유전자들로 fatty acid synthase (FAS), acetyl-CoA carboxylase (ACC) 등을 측정하였다.¹³ 지질 합성 관련 전사인자 중 SREBP-1c의 발현 감소 및 PPAR γ 발현 증가가 FBHD군에서 나타났다. 특히 블루베리발효액은 섭취하였을 때 지질 합성 유전자 중 ACC의 mRNA 발현을 유의적으로 감소하였고 FAS 발현은 유의적 차이는 없으나 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 2a). 지방 분해 및 산화와 관련된 유전자로 PPAR α , hormone sensitive lipase (HSL) 및 adipose triglyceride lipase (ATGL), carnitine palmitoyltransferase-1-alpha (CPT-1 α)¹⁴ 및 acyl-CoA oxidase (ACOX) 발현을 측정하였다. 지방산 산화에 관여하는 ACOX의 발현은 FBHD군에서 HD군과 비교 시 유의적으로 증가하였다. ACOX를 제외한 다른 유전자 발현은 유의적 차이를 보이지 않으나 FBHD는 HD에 비해 증가하는 경향을 보였다.

고 찰

경제가 발달하면서 고혈압, 당뇨병, 심혈관질환 등 다양한 만성질환을 유발 시키는 비만율이 증가하고 있다.² 이에 건강과 관련된 다양한 기능성 식품에 대한 관심이 증가하면서 식품의 기능성 개발 및 연구가 이루어지고 있다. 발효는 영양 성분들이 소화, 흡수되기 좋은 형태로 변환될 뿐 만 아니라 그 과정을 통해 다양한 기능성 성분을 함유하게 되므로 기능성 식품이 된다.³ 그러므로 본 연구에서는 블루베리액의 항비만 효과 및 발효에 의한 효과 차이를 살펴보기 위해, 고지방식이로 비만을 유도한 C57BL/6J mice에 블루베리발효액을 섭취시켜 효능을 검증하였다.

연구들에 따르면 약 60 kg의 성인이 하루에 무리 없이 섭취 가능한 과일 양이 100 ~ 200 g으로 알려져 있어,^{15,16} 이를 mice의 섭취량으로 환산하여 본 연구에서는 10 ml/kg에 블루베리 2.5 g으로 섭취 시켰다. 본 연구에서 고지방식이로 유도한 비만 mice에 블루베리액을 10 ml/kg

BW/day (블루베리액 12%)로 섭취시킨 결과, 블루베리액 특히 발효액은 체중 및 체지방 감소, 혈중 지질 감소를 나타냈다. 이는 Mykkanen 등¹⁷의 고지방식이를 섭취한 mice에 10% 블루베리 투여 시 체중이 유의적으로 감소하고 체지방 및 총 콜레스테롤 함량이 감소 경향을 나타냈다는 결과와 유사하였다. 또한 블루베리의 주요 기능성 성분이라고 알려진 안토시아닌 성분은 간을 포함한 여러 조직들에 축적된 지방 감소 효과 및 지질 대사 조절 기능을 한다고 보고되고 있다.^{18,19} 특히 블루베리는 베리류 중 안토시아닌 함량이 높은 편인 것으로 알려져 있다.²⁰ Prior 등²¹은 블루베리 정제 안토시아닌 추출물을 고지방식이 mice에게 섭취 시켜 비교 분석한 결과, 하루에 2.83 ± 0.26 mg의 안토시아닌 추출물을 섭취한 mice가 고지방식이 대조군보다 체중 및 체지방 감소, 근육 증가를 하였다고 보고하였다. 블루베리의 안토시아닌 및 총 폴리페놀 함량에 관한 여러 연구에 의하면 재배환경 및 품종, 분석, 추출방법 등에 따라서 차이를 나타내지만, 블루베리 내 함유된 안토시아닌은 1.2 ~ 1.5 mg/g, 총 폴리페놀은 3.95 ~ 4.12 mg/g으로 알려져 있다.^{20,22} 본 연구의 mice에 투여한 블루베리액에 함유된 블루베리는 2.5 g이고, 추정되는 함유 안토시아닌은 약 3.75 mg이므로 위의 연구 결과와 비슷한 농도에서 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 블루베리액 및 발효액의 체중 및 부고환지방 감소 효과는 블루베리의 높은 안토시아닌 함량에 의해 지질 감소 효과를 나타낸 것으로 사료된다.

본 연구에서 블루베리액 및 발효액 투여군은 간의 중성지방과 총 콜레스테롤의 감소 효과를 나타내었다. 이는 Coban 등²³의 고콜레스테롤식이에 3.8 ~ 4 g의 블루베리를 섭취시킨 돼지 연구와 Wu 등²⁴의 블루베리와 머루 주스를 자율 급식한 연구 (블루베리 평균 섭취량 4.83 ml)에서 간 내 총 콜레스테롤 및 중성지방 함량이 유의적으로 감소하였다는 보고와 일치하는 결과를 나타내었다. 본 연구에서 투여된 블루베리액량 (블루베리 2.5 g, 블루베리액 10 ml)이 다른 연구보다 적거나 혹은 많음에도 불구하고 유사한 결과를 나타내었고, 블루베리 내 안토시아닌의 항비만 효과가 보고된 바 있어서, 본 연구의 지질 감소 효과는 블루베리에 함유된 기능성 성분인 안토시아닌의 효과로 사료된다. 특히 발효된 블루베리액 섭취군에서 간 내 중성지방은 감소하는 경향을 나타내며 콜레스테롤은 유의적으로 감소하는 것으로 나타나, 발효로 인해 블루베리의 지질 저해 효과가 증진되는 것으로 보인다.

LDL-콜레스테롤은 총 콜레스테롤 수치보다 동맥경화를 일으키는 주요한 인자로 알려져 있으며 혈중 농도가 높을수록 위험도가 커지게 된다.^{25,26} HDL-콜레스테롤은 말초 조직에서 간으로 과잉의 콜레스테롤을 운반하고 거품세포

의 형성을 방해하므로 동맥경화를 개선시켜주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.²⁷ Kalt 등²⁸은 돼지에게 블루베리 가루를 첨가한 basal diets를 섭취시킨 연구 결과, 블루베리 가루 1%와 2% 첨가 식이에서 LDL-콜레스테롤 농도 감소, HDL-콜레스테롤 농도 증가 효과를 보고하였다. 블루베리의 수분함량은 약 80%이며 블루베리 가루는 블루베리 성분이 5배 농축되었으므로, 본 실험에서의 블루베리 함량과 유사한 농도로 혈중 콜레스테롤 개선 효과를 나타내었다.

발효에 의한 베리류의 기능성 차이는 Johnson 등²⁹의 연구에서 발효된 블루베리-블랙커런트 주스의 안토시아닌 함량에 따라 농도 의존적으로 항비만 효과를 나타내었고, Kim 등³⁰은 *in vitro*에서 아로니아 추출물의 항산화 기능을 비교해 본 결과 1.0 mg/ml 농도에서 아로니아 에탄올 추출물은 발효로 인해 항산화 기능이 증진되었다고 보고하였다. 또한 Park과 Jang³¹은 여러 종류의 폴리페놀 물질 등을 함유한 대나무 추출물의 고콜레스테롤식이 투여 rat의 혈중 지질에 미치는 영향을 알아본 결과, 항산화 기능을 가진 폴리페놀 및 피토케미컬들로 인해 콜레스테롤 조성 개선 효과를 나타내었다. 대나무에서 유래된 폴리페놀 물질의 항산화 기능성이 콜레스테롤 감소에 영향을 미친 것과 같이 블루베리 및 아로니아 같은 베리류도 발효로 인해 증가된 항산화 기능성 또는 다른 기능성 성분이 콜레스테롤 조성 변화에 영향을 미친 것으로 유추 및 사료된다. 식품에 함유되어 있는 플라보노이드는 LDL-콜레스테롤 감소를 위해 콜레스테롤 역 운송에 영향을 미치고,³² LDL-콜레스테롤의 산화를 억제시켜 죽상동맥경화증을 예방하고 연관된 혈관염증인자를 감소시킨다.³³ 그러므로 안토시아닌을 포함하여 다양한 플라보노이드를 함유한 블루베리발효액을 꾸준히 섭취한다면 HDL-콜레스테롤의 증가와 LDL-콜레스테롤의 감소로 인해 동맥경화의 발생 위험을 감소시킬 것으로 사료된다. 중성지방은 HD군에 비해 BHD군과 FBHD군이 증가하였으나, Yu와 Lim의³⁴ 연구에 따르면 증가된 콜레스테롤의 운반을 위해 많은 양의 중성지방이 혈중으로 유리되었다고 하므로 FBHD군에서 중성지방의 증가는 블루베리발효액으로 인한 생체 내 콜레스테롤 이동변화와 관련 있는 것으로 사료된다. VLDL-콜레스테롤이 중성지방 수치와 같이 증가한 결과는 VLDL-콜레스테롤은 주로 간에서 중성지방을 조직으로 운반하는 역할을 한다는 연구에 따라 혈중 중성지방의 증가와 관련이 있는 것으로 보인다.³⁵ Wang 등³⁶의 연구에서는 고지방/저단백질 식이와 CCl₄로 간 섬유화가 유도된 rat에게 블루베리주스 (15 g/kg)를 투여한 결과, 간 섬유화 및 산화적 스트레스가 유의적으로 감소하였다. Yoon 등⁹은 블루베리

주스와 블루베리 발효주의 환원력을 측정한 결과, 농도에 의존적 및 발효에 의해 높은 환원력을 나타내었다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 블루베리발효액에 의해 감소한 AST 및 ALT 농도는 블루베리의 간 손상 감소 효과 및 발효에 의해 증진되는 항산화 기능성에 의해 효과적으로 억제된 것으로 사료된다.

렙틴은 지방조직에서 만들어지고 혈중으로 분비되는 호르몬으로써 지방이 과잉 축적되면 생성이 증가하게 되는데 체중 및 체지방량에 따라 비례하는 것으로 보고되어 있다.³⁷ 아디포넥틴은 지방조직에서 만들어져 분비되며 비만일 때, 아디포넥틴 농도가 감소된다고 알려져 있다.^{38,39} 블루베리액의 혈중 렙틴 농도에 미치는 영향은, 본 연구의 블루베리액 투여보다 낮은 농도인 하루 평균 4.83 ml의 블루베리주스를 섭취한 식이유도 비만 쥐의 혈중 렙틴 농도가 감소하여²⁴ 본 연구와 유사한 결과를 보고하였다. 따라서 본 연구의 블루베리액 및 발효액의 렙틴 저하 효과는 블루베리 및 블루베리발효액의 체중 및 체지방 감소에 의한 것으로 사료된다. 특히 발효에 의한 블루베리액의 효능 증가는 Yoon 등⁹의 발효된 블루베리의 총 폴리페놀함량 및 항산화 활성이 증가되었다는 보고와 Kim 등³⁰의 아로니아 에탄올 추출물 및 발효 에탄올 추출물의 안토시아닌 함량이 발효에 의해 4.58 mg/g 증가하였다는 보고와 유사하였다. 그리고 Im과 Lee⁴⁰는 비발효보다 발효된 황칠나무 잎 추출물의 폴리페놀 함량이 증가되어 피부 미백 효과가 증진됨을 보고하였다. 이에 본 연구에 BHD군에 비해 FBHD군의 혈중 콜레스테롤 조성 변화 및 렙틴 저해 효과가 더 증진된 것은 발효에 의해 블루베리의 기능성 성분인 폴리페놀 함량 혹은 다른 기능성 성분의 함량이 높아지면서 나타난 것으로 보인다.

혈중 지질 및 간 내 지질 함량 변화는 간의 지질 합성, 지질 분해 및 산화 등 다양한 메카니즘에 의해 조절된다. 지질 합성에 관여하는 유전자 중 ACC는 acetyl-CoA를 malonyl-CoA로 전환시켜 지방 합성을 촉진시키며, malonyl-CoA는 CPT-1의 발현을 불활성화 시켜 지방 산화작용을 억제시킨다.⁴¹ FAS는 acetyl-CoA와 malonyl-CoA로부터 지방산을 생성하는 중요한 효소로서, 탄수화물 식이 시 1차적으로 전사유도를 하여 발현이 되며 FAS의 과 발현은 중앙 변환과 관련된 것으로 알려져 있다.⁴² 본 연구에서 ACC와 FAS 발현이 블루베리발효액을 섭취한 FBHD군에서 가장 낮게 발현된 것으로 나타나 특히 발효된 블루베리가 지방 합성을 억제시키는 것으로 보인다. SREBP-1c는 지방세포가 분화하는 과정 중, 초기에 발현이 유도되며, PPAR γ 전사활성을 촉진시켜 중성지방을 축적시키는 역할을 하는 acyl-CoA synthase 등의 발현을 증가시킨

다.^{43,44} Benn 등⁴⁵의 연구에서 고지방/고콜레스테롤 식이로 비만이 유도된 C57BL/6J mice에 블랙커런트를 섭취시켜 지방조직의 지방 합성 유전자 발현을 조사해본 결과 SREBP-1c 발현은 감소하고 PPAR γ 발현은 증가하여 체중 감소 효과를 나타내 본 연구 결과와 유사한 결과를 나타내었다. 특히 이는 발효로 인해 폴리페놀 혹은 기능성 성분 함량이 증가한 블루베리가 고지방식으로 비만을 유도한 mice 모델에서 간의 지방 합성 유전자 SREBP-1c 및 PPAR γ 발현의 조절에 영향을 주어 체중 및 체지방 감소 효과를 나타낸 것으로 사료된다 (Fig. 2a). 지방 분해 및 산화 메커니즘의 경우, PPAR α 은 간, 갈색지방 및 근육에서 발현되며 지방산의 β -oxidation 촉진, 중성지방 합성 감소, HDL-콜레스테롤 농도를 증가 시키고,^{46,47} 지방산 산화를 증가시키는 CPT-1 α ⁴⁴와 중성지방의 분해 초기 단계에서 diglyceride 생성에 관여하는 ATGL⁴⁸ 발현을 증가시킨다. 그리고 HSL은 중성지방을 지방산과 글리세롤로 가수분해하는 효소이며, ACOX는 지방 산화에 관여를 한다. Harness⁴⁹의 연구에서 고지방/고콜레스테롤 식이로 비만이 유도된 C57BL/6J mice에 폴리페놀이 풍부한 블랙커런트 추출물을 섭취시켜 지방조직의 지방 산화 관련 유전자 발현을 측정해본 결과, CPT-1 α , ACOX-1, PPAR α 그리고 PPAR δ 발현이 증가된 것으로 나타나 본 연구의 FBHD군의 지방 산화 유전자의 발현 증가와 유사한 것으로 나타났다. 블루베리액 및 발효액은 지방 산화 유전자의 발현을 조절하여 체중 및 체지방 감량 및 혈중 지질 대사에 영향을 미쳐 항비만 효과를 나타낸 것으로 보인다. 블루베리액 및 블루베리발효액의 항비만 생리활성 효과를 가지는 기능성 물질, 특히 발효로 인해 이 생리활성 물질이 증진되는 지에 대한 연구가 더 필요하다고 사료된다.

요 약

본 연구는 발효시킨 블루베리액이 고지방식으로 비만이 유도된 C57BL/6J mice에 미치는 항비만 효과 및 기전에 대해 평가하였다. 실험동물은 각 7마리씩 3군으로 나누어 고지방식이와 증류수를 섭취하는 HD군, 고지방식이와 블루베리액을 섭취하는 BHD군, 고지방식이와 블루베리발효액을 섭취하는 FBHD군으로 사육하였다. 경구투여량은 10 mg/kg BW/day로 설정하였고, 이는 12%의 블루베리액 (2.5 g 블루베리 함유; 블루베리 함유 안토시아닌 함량은 약 3.75 mg, 총 폴리페놀은 약 10.3 mg 추정)을 나타낸다. 본 연구 결과, 블루베리액과 블루베리발효액은 체중 감소, 체지방량 감소, 간의 중성지방과 총 콜레스테롤 함량을 감소시켰다. 그리고 혈중 LDL-콜레스테롤을 낮추고, HDL-

콜레스테롤을 증가시켰으며 AST 및 ALT 농도를 감소시켰다. 또한 렘틴 농도가 낮아졌으며 지방 합성 유전자 발현에서는 SREBP-1c, ACC 발현 수준이 유의적으로 낮아졌으며, 지방 산화 유전자 발현에서는 블루베리발효액의 ACOX 발현 수준이 유의적으로 증가하였다. 결론적으로 BHD군과 FBHD군이 항비만 효과를 나타냈었으며, 특히 FBHD군이 BHD군보다 간에서 총 콜레스테롤 20%, AST 9%, ALT 52%, 지방 합성 유전자 SREBP-1c 발현을 감소시켰고, 혈중 HDL-콜레스테롤 16.4%와 지방 산화 유전자 ACOX 발현을 유의적으로 증가시켰다. 따라서 본 실험의 결과, 블루베리는 고지방 섭취로 인한 콜레스테롤 및 지질 변화에 감소 효과를 나타내며, 특히 발효를 통해 기능성이 더욱 증진되는 것으로 나타났다. 발효과정은 블루베리의 항비만 효과를 증진시키며 블루베리발효액은 기능성 식품으로서 이용가치가 높을 것으로 사료된다.

References

- Hong SH. Obesity and subjective well-being. Korean J Health Econ Policy 2015; 21(1):31-49.
- Moriarty JP, Branda ME, Olsen KD, Shah ND, Borah BJ, Wagie AE, Egginton JS, Naessens JM. The effects of incremental costs of smoking and obesity on health care costs among adults: a 7-year longitudinal study. J Occup Environ Med 2012; 54(3): 286-291.
- Kim RU. Identification and characterization of soy yogurt-forming lactic acid bacteria [dissertation]. Busan: Pusan National University; 2010.
- Chun JM, Bae JH. Preparation of fermented citrus peels extracts for their antimicrobial activity against Campylobacter jejuni. Korean J Food Cult 2015; 30(4): 475-480.
- Bae MJ, Kim SJ, Ye EJ, Nam HS, Park EM. Study on the chemical composition of lotus root and functional evaluation of fermented lotus root drink. Korean J Food Cult 2008; 23(2): 222-227.
- Jeong CH, Choi SG, Heo HJ. Analysis of nutritional compositions and antioxidative activities of Korean commercial blueberry and raspberry. J Korean Soc Food Sci Nutr 2008; 37(11): 1375-1381.
- Su MS, Chien PJ. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. Food Chem 2007; 104(1): 182-187.
- Lee DH, Hong JH. Physicochemical properties and storage stability of blueberry fermented by lactic acid bacteria. Korean J Food Preserv 2015; 22(6): 796-803.
- Yoon HH, Chae KS, Son RH, Jung JH. Antioxidant activity and fermentation characteristics of blueberry wine using traditional yeast. J Korean Soc Food Sci Nutr 2015; 44(6): 840-846.
- Choi SH. Quality characteristics of Korean wheat bread prepared with substitutions of naturally fermented blueberry starters. J East Asian Soc Diet Life 2013; 23(5): 546-560.

11. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18(6): 499-502.
12. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226(1): 497-509.
13. Koppen A, Kalkhoven E. Brown vs white adipocytes: the PPAR γ coregulator story. *FEBS Lett* 2010; 584(15): 3250-3259.
14. Ferré P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* 2004; 53 Suppl 1: S43-S50.
15. Shin JH, Han SM, Kim AJ. The effects of mulberry extract consumption on the serum levels of oxidant and inflammatory factors in middle-aged women with rheumatoid factors. *J Korea Acad Ind Coop Soc* 2012; 13(8): 3561-3569.
16. Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Bergillos-Meca T, Tabatabaee S, George TW, Heiss C, Spencer JP. Intake and time dependence of blueberry flavonoid-induced improvements in vascular function: a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study with mechanistic insights into biological activity. *Am J Clin Nutr* 2013; 98(5): 1179-1191.
17. Mykkänen OT, Huotari A, Herzig KH, Dunlop TW, Mykkänen H, Kirjavainen PV. Wild blueberries (*Vaccinium myrtillus*) alleviate inflammation and hypertension associated with developing obesity in mice fed with a high-fat diet. *PLoS One* 2014; 9(12): e114790.
18. Tsuda T, Horio F, Uchida K, Aoki H, Osawa T. Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J Nutr* 2003; 133(7): 2125-2130.
19. Vendrame S, Daugherty A, Kristo AS, Klimis-Zacas D. Wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*)-enriched diet improves dyslipidaemia and modulates the expression of genes related to lipid metabolism in obese Zucker rats. *Br J Nutr* 2014; 111(2): 194-200.
20. Zheng W, Wang SY. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J Agric Food Chem* 2003; 51(2): 502-509.
21. Prior RL, Wu X, Gu L, Hager TJ, Hager A, Howard LR. Whole berries versus berry anthocyanins: interactions with dietary fat levels in the C57BL/6J mouse model of obesity. *J Agric Food Chem* 2008; 56(3): 647-653.
22. Koca I, Karadeniz B. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Sci Hort (Amsterdam)* 2009; 121(4): 447-450.
23. Çoban J, Evran B, Özkan F, Çevik A, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Effect of blueberry feeding on lipids and oxidative stress in the serum, liver and aorta of guinea pigs fed on a high-cholesterol diet. *Biosci Biotechnol Biochem* 2013; 77(2): 389-391.
24. Wu T, Tang Q, Gao Z, Yu Z, Song H, Zheng X, Chen W. Blueberry and mulberry juice prevent obesity development in C57BL/6 mice. *PLoS One* 2013; 8(10): e77585.
25. Park SJ, Jeon YJ, Kim HJ, Han JS. Anti-obesity effects of *Ishige okamurae* extract in C57BL/6J mice fed high-fat diet. *Korean J Food Sci Technol* 2013; 45(2): 199-205.
26. Gotto AM Jr, Farmer JA. Drug insight: the role of statins in combination with ezetimibe to lower LDL cholesterol. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3(12): 664-672.
27. Tall AR. Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherogenesis. *J Clin Invest* 1990; 86(2): 379-384.
28. Kalt W, Foote K, Fillmore SA, Lyon M, Van Lunen TA, McRae KB. Effect of blueberry feeding on plasma lipids in pigs. *Br J Nutr* 2008; 100(1): 70-78.
29. Johnson MH, Wallig M, Luna Vital DA, de Mejia EG. Alcohol-free fermented blueberry-blackberry beverage phenolic extract attenuates diet-induced obesity and blood glucose in C57BL/6J mice. *J Nutr Biochem* 2016; 31(31): 45-59.
30. Kim NY, Lee YD, Cho SC, Shin YC, Lee HY. Enhancement of anti-inflammation effect by fermentation process in *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott extract. *Korean J Med Crop Sci* 2014; 22(6): 475-482.
31. Park JO, Jang HW. Effects of *Sasa coreana* Nakai on the lipid compositions of serum in high cholesterol diet rats. *J Life Sci* 2009; 19(8): 1145-1151.
32. Reed J. Cranberry flavonoids, atherosclerosis and cardiovascular health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2002; 42(3 Suppl): 301-316.
33. Castellani WJ. Metabolic and nutritional aspects of the atherogenic atypical lipoproteins: lipoprotein (a), remnant lipoproteins, and oxidized low-density lipoprotein. *Nutr Res* 2004; 24(9): 681-693.
34. Yu EJ, Lim HS. Effect of egg yolk supplementation to Korean-diet on human serum cholesterol. *Korean J Nutr* 1988; 21(4): 260-267.
35. Jang JY, Lee MK, Kim MJ, Cho SY. Effect of fiber on serum lipid metabolism in rats with diet-induced cholesterolemia. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1998; 27(6): 1211-1216.
36. Wang Y, Cheng M, Zhang B, Nie F, Jiang H. Dietary supplementation of blueberry juice enhances hepatic expression of metallothionein and attenuates liver fibrosis in rats. *PLoS One* 2013; 8(3): e58659.
37. Kim EJ, Kim YE, Kim GY. The anti-obesity effects of treadmill exercise and *Gastrodia elata* on the obesity rats induced high-fat diet. *J Exerc Nutr Biochem* 2007; 11(2): 61-68.
38. Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, Retzlaff BM, Knopp RH, Brunzell JD, Kahn SE. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 2003; 46(4): 459-469.
39. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(5): 1930-1935.
40. Im DY, Lee KI. Melanin production inhibitory activity of the dendropanax moribifera leaf extract fermented by *Lactobacillus plantarum*. *Korean J Pharmacogn* 2016; 47(1): 18-23.
41. Bae CR, Kwon DY, Cha YS. Anti-obesity effects of salted and unsalted Doenjang supplementation in C57BL/6J mice fed with high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2013; 42(7): 1036-1042.
42. Yang Y, Morin PJ, Han WF, Chen T, Bommman DM, Gabrielson

- EW, Pizer ES. Regulation of fatty acid synthase expression in breast cancer by sterol regulatory element binding protein-1c. *Exp Cell Res* 2003; 282(2): 132-137.
43. Gervois P, Torra IP, Fruchart JC, Staels B. Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38(1): 3-11.
44. Park MJ. Recent advances in regulating energy homeostasis and obesity. *Korean J Pediatr* 2005; 48(2): 126-137.
45. Benn T, Kim B, Park YK, Wegner CJ, Harness E, Nam TG, Kim DO, Lee JS, Lee JY. Polyphenol-rich blackcurrant extract prevents inflammation in diet-induced obese mice. *J Nutr Biochem* 2014; 25(10): 1019-1025.
46. Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Sorting out the roles of PPAR α in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* 2006; 116(3): 571-580.
47. Murakami K, Tobe K, Ide T, Mochizuki T, Ohashi M, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T. A novel insulin sensitizer acts as a coligand for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alpha) and PPAR-gamma: effect of PPAR-alpha activation on abnormal lipid metabolism in liver of Zucker fatty rats. *Diabetes* 1998; 47(12): 1841-1847.
48. Zmuda-Trzebiatowska E, Oknianska A, Manganiello V, Degerman E. Role of PDE3B in insulin-induced glucose uptake, GLUT-4 translocation and lipogenesis in primary rat adipocytes. *Cell Signal* 2006; 18(3): 382-390.
49. Harness E. The effect of polyphenol-rich black currant extract on lipogenic and inflammatory gene expression in diet induced obesity mice [dissertation]. Storrs (CT): University of Connecticut; 2015.