

생균제 및 Colistin® 복합 첨가제의 급여가 산란계의 생산성과 계란의 품질에 미치는 영향

윤지연¹ · 김재영¹ · 김지숙¹ · 이보근¹ · 안병기¹ · 황용배² · 강성기² · 김동건² · 강창원^{1,†}

¹건국대학교 동물생명과학대학, ²(주) 제일바이오 연구소 생명공학실

Effects of Feeding Mixture of Probiotics and Colistin® on Performance and Egg Quality in Laying Hens

J. Y. Yun¹, J. Y. Kim¹, J. S. Kim¹, B. K. Lee¹, B. K. Ahn¹, Y. B. Hwang², S. K. Kang², D. G. Kim² and C. W. Kang^{1,†}

¹College of Animal Bioscience and Technology, Konkuk University, ²Biotechnology Department of CHEILBIO Institute, CHEILBIO Co. Ltd.

ABSTRACT This experiment was conducted to evaluate the dietary effects of mixture of probiotics and colistin on laying performance, intestinal microflora and egg yolk cholesterol in laying hens. One hundred sixty 50-wk-old Hy-Line Brown layers were divided into four treatments and fed a commercial diet (Control) or experimental diets containing 0.2% mixture of probiotics and probiotics and colistin mixture (T1, *Bacillus subtilis* + *Aspergillus oryzae* + *Lactobacillus plantarum*; T2, *Bacillus subtilis* + *Aspergillus oryzae*; T3, *Bacillus subtilis* + *Aspergillus oryzae* + colistin) for 8 wk. No significant differences were found in laying performance and liver weight among the groups. The Haugh unit of treated groups were significantly improved ($P < 0.05$) compared to that of control, but eggshell qualities were not changed by the treatments. The cecal ammonia concentration was significantly decreased in both T1 and T3 groups. The number of *coli* forms in cecal content and feces were significantly reduced in all treated groups compared to that of Control ($P < 0.05$). The egg yolk cholesterol contents in the groups fed the diet containing mixture of probiotics and colistin were reduced in comparison with that of Control. In conclusion, dietary supplementation of mixture of probiotics and colistin improved quality of egg albumen, and reduced the egg cholesterol contents. They also reduced intestinal coli forms without harmful effects on overall productive and physiological responses in laying hens.

(Key words : probiotics, colistin, yolk cholesterol, cecal ammonia concentration, laying hens)

서 론

항생제는 축산업에서 가축의 질병 예방과 치료 목적으로 이용되어 왔으나, 축산물의 항생제 잔류 및 전이(Mee, 1984)와 항생제에 내성을 가진 슈퍼박테리아의 등장 등 여러 문제점이 대두되어 사용이 금지 및 제한되고 있다. 따라서 항생제와 달리 섭취에 따른 내성이 없는 항생제 대체제로서 생균제에 관한 연구가 오랜 기간 진행되어왔다(Rowghani와 Akbarian, 2007). 단일 생균제는 자체로 충분한 생균제의 효과를 나타낼 수 있는 선발된 미생물제이며, 혼합 생균제는 선발된 단일 미생물간 상호 효과를 이용하여 상승 효과가 가능한 2종 이상의 미생물군을 조합한 것이다. Timmerman 등(2004)은 가금에서의 단일 제제에 비해서 2종 이상이 조합된

복합 생균제의 사용이 더 효과가 있다고 보고하였는데, Mohan 등(1995, 1996)은 산란계 사료 내 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium vifidum*, *Aspergillus oryzae*와 *Torulopsis*로 제조된 복합 생균제를 100 mg/kg과 150 mg/kg 수준으로 급여하면 질병이나 스트레스가 부여되지 않은 통상적인 조건에서 산란율 증가 및 난각질 개선 효과가 나타났다 고 하였다. Tortuero와 Fernandez(1995)도 산란계 사료 내 건조 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*(2.3×10^8 cfu/g)와 농축된 *Bacillus cereus*(10^9 cfu/g) 및 *Streptococcus faecium*(1.5×10^9 cfu/g)가 혼합된 생균제의 급여는 산란계의 산란율, 사료 효율, 난중 및 난백의 품질을 개선시켰다는 결과를 보고하였다.

Colistin은 토양 세균인 *Bacillus polymyxa* var. *colistinus*에

[†] To whom correspondence should be addressed : kkucwkang@empal.com

서 추출한 그램 음성균에 항균 활성을 가진 항생제이다(Ziv, 1981). Colistin은 *Salmonella*와 *E. coli* 등 그램 음성균에 효과적으로 작용하며(Catchpole 등, 1997), 소화관 내에서는 흡수가 되지 않고 산란계 사료 내 첨가 시 계란 내 전이가 되지 않는다는 이점이 있다(Roudaut, 1989). 실제 농장에서는 불가피하게 가축에게서 그램 음성 병원균의 예방과 치료 목적으로 colistin과 같은 항생제의 사용이 빈번하게 이루어지고 있으나, 항생제와 생균제의 병용이 생균제의 활성이나 가축에게 부정적인 영향을 주는지에 대한 연구가 전무한 실정이다. Colistin은 그램 음성균에 작용하기 때문에 그램 양성균인 *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*의 복합제제와 함께 병용 시, 생균제로서의 이점과 더불어 항생제의 이점을 함께 이용할 수 있을 것이라 예상된다.

따라서 본 연구는 먼저 산란계에 *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae* 및 colistin으로 이루어진 복합 첨가제를 급여하였을 때 난 생산성 및 난각질과 내부 난질에 미치는 영향을 조사하기 위해 실시하였다. 또한, 장내 미생물 조성과 계분 암모니아 발생에 미치는 영향과 난황 내 콜레스테롤 저장 여부를 함께 조사하였다.

재료 및 방법

1. 공시 동물, 사양 관리 및 실험 사료

50주령의 Hy-Line Brown 산란계 160수를 가로×세로×높이(전면)×높이(후면)가 각각 36×40×42×38 cm인 산란계 2수용 케이지 80개에 처리구별 산란율과 체중이 유사하도록 배치한 후 실험에 이용하였다. 모두 4개 처리구(Control, T1, T2 및 T3) 로서, 처리당 4반복, 반복 당 10수씩 공시되었다. 2주간 일반 시판사료로 예비 사육하였으며, 사료 급이기와 니플의 숫자는 반복구별로 동일하게 배치하여 자유채식 및 자유음수시켰고, 점등은 16L : 8D로 일정하게 유지하였으며, 기타 사양 관리는 일반적으로 행해지고 있는 국내 사양관리 방법에 준하여 실시하였다. 사료는 옥수수-대두박을 기초로 하여 대사에너지 2,800 kcal/kg과 16.1%의 조단백질 그리고 기타 영양소의 수준은 NRC 요구량(1994)에 맞추거나 상회하도록 기초 사료를 배합하여 Control 사료로 사용하였다. 각 처리구에 따라 시료를 사료 내 0.2% 첨가하여 실험을 실시하였다(Table 1).

2. 실험 시료

사용한 *Bacillus subtilis*(5×10^6 /g), *Lactobacillus plantarum*

Table 1. Formula and chemical composition of the Control and experimental diets¹

Ingredients (%)	Control	Experimental (T1, T2, T3)
Corn	65.52	65.32
Lupin seed	4.00	4.00
Soybean meal	13.96	13.96
Rapeseed meal	2.00	2.00
Meat meal	3.00	3.00
Limestone	9.51	9.51
Dicalcium phosphate	0.55	0.55
Salt	0.25	0.25
Tallow	0.80	0.80
Choline-chloride (50%)	0.08	0.08
DL-met	0.07	0.07
Mineral mix ²	0.10	0.10
Vitamin mix ³	0.10	0.10
Phytase	0.06	0.06
Experimental mixture	–	0.20
Total	100.00	100.00
Calculated value of basal diet (%)		
Dry matter		88.80
Crude protein		16.10
Ether extract		2.95
Crude fiber		3.40
Crude ash		11.97
Ca		3.86
Available P		0.50
Met+Cys		0.65
TME _n (kcal/kg)		2,800

¹ Control, probiotics and antibiotics free; T1, 0.2% probiotics (*Bacillus subtilis*+*Aspergillus oryzae*+*Lactobacillus plantarum*); T2, 0.2% probiotics(*Bacillus subtilis*+*Aspergillus oryzae*); T3, 0.2% antibiotics+probiotics(*Bacillus subtilis*+*Aspergillus oryzae*+colistin)

² Mineral mixture provided following nutrients per kg of diet: Fe, 48 mg; Zn, 60 mg; Mn, 72 mg; Cu, 5 mg; I, 1 mg; Se, 0.18 mg; Co, 0.24 mg.

³ Vitamin mixture provided following nutrients per kg of diet: vitamin A, 12,000 IU; vitamin D₃, 3,000 IU; vitamin E, 21 IU; vitamin K₃, 2.4 mg; vitamin B₁, 1.2mg; vitamin B₂, 4.8 mg; vitamin B₆, 2.4 mg; vitamin B₁₂, 0.02 mg; niacin, 15 mg; pantothenic acid, 10 mg; folic acid, 0.3 mg.

(2×10^5 /g)와 *Aspergillus oryzae*(1×10^6 /g), 항생제인 colistin(7.0 cmg/g)은 (주)제일바이오에서 공급받았으며, 70% *Bacillus subtilis* + 15% *Aspergillus oryzae* + 15% *Lactobacillus plantarum*(T1), 50% *Bacillus subtilis* + 50% *Aspergillus oryzae*(T2) 및 15% *Bacillus subtilis* + 15% *Aspergillus oryzae* + 70% colistin(T3)의 비율로 혼합하여 사용하였다.

3. 조사 항목

1) 사료 섭취량, 난 생산성과 간 중량

사료 섭취량은 매주 총 급여량에서 잔량을 제외하여 측정하였고, 실험 기간 동안 매일 오후 2시에 수집한 정상 산란 개수와 연관, 파란 등을 합한 총 산란 개수를 사육수수로 나누어 산란율을 구하였으며, 수집한 정상란 전부를 칭량하여 정상 계란 수로 나누어 평균 난중을 산출하였다. 실험 종료 시에 처리구의 반복구 별로 2수씩 선발하여 도살한 후 간을 채취하여 중량을 측정하였고, 생체중 100 g당 상대적인 중량으로 환산하였다.

2) 난질 및 난각질

실험 사료를 급여하여 생산된 계란 중 평균치에 해당하는 계란을 2주 간격으로 수집하여 난각 강도, 난각 두께 및 Haugh unit 등 계란의 내부 난질 및 난각질 관련 항목을 측정하였다. 난각 강도는 FHK(Fujihara Co., Ltd., Saitama, Japan)를 이용하여 계란의 둔단부를 위로 하고 수직으로 고정된 후 압력을 가하여 파각되는 순간의 압력을 측정하였다. 난각 강도 측정 후 난백의 높이를 조사하여 난중을 대비한 Haugh unit 수치를 구하였다(QCM+, Technical Services and Supplies Ltd., York, England). 난각 두께는 계란의 중앙부 난각 파편을 채취하여 난각 후도계(Digimatic Micrometer, Series 293~330, Mitutoyo, Japan)를 통해 측정된 두께의 평균치로 하였다. 난황 색은 Roche egg yolk color fan(Yolk color fan, Roche, Switzerland)과 대조한 색도로서 표시하였다. 난각 색도는 egg shell color fan(Egg shell color fan, 삼양사)과 대조한 색도로서 표시하였다.

3) 혈액 콜레스테롤 농도와 간 기능 관련 효소의 활성

9주간의 실험 종료 후, 각 처리구에서 유사한 체중을 가진 개체에서 혈액을 채취하여 원심분리 후 혈청을 분리하였고, glutamic-oxaloacetic transaminase(GOT) 및 glutamic-pyruvic transaminase(GPT) 활성은 진단용 kit(GOT-GPT kit, 영동제약)를 사용하여 비색 방법으로 분석하였다. 혈청 내 총 콜레스테롤

및 HDL-콜레스테롤 농도는 진단용 콜레스테롤 kit(콜레스테롤 E kit, HDL-콜레스테롤 kit, 영동제약)를 사용하여 비색 방법으로 분석하였다.

4) 장내 미생물 균총

9주간의 실험 종료 후, 생체중 측정치의 평균에 해당하는 개체를 처리구 별로 8 수씩 선발하여 도살한 후 맹장을 내용물과 함께 적출하여 냉동 보관하였다. 이후 멸균된 생리식염수에 현탁하여 균질화시킨 다음 10^{-3} 에서 10^{-7} 까지 계단 희석하여 생균수 측정용 시료로 사용하였다. 실험 처리에 의한 맹장 내의 total microbes, lactic acid bacteria, coli forms의 균수를 측정하기 위해 총 세균에는 total plate agar(Difco), lactic acid bacteria에는 MRS agar, coli forms에는 MacConkey agar(Difco)를 사용하였고, 37 °C에서 38시간 배양 후 균수 측정을 하였다.

5) 분내 미생물 균총

계분의 채취는 2주 간격으로 이루어졌으며 처리구별 10 수를 선발하여 24시간 동안 배설된 분을 채취하였다. 깃털과 이물질 등을 제거한 후 잘 혼합하여 실험 시까지 -20 °C에서 냉동 보관하였으며, 실험 방법은 장내 미생물 분석 방법과 동일하게 시행하였다.

6) 맹장 내 암모니아 농도의 측정

장내 암모니아 측정을 위해 9주간의 실험 종료 후, 생체중 측정치의 평균에 해당하는 개체를 처리구 별로 8수씩 선발하여 도살한 후 맹장을 내용물과 함께 적출하여 냉동 보관하였다. 이후 맹장 내용물 1 g을 취하여 탈이온수로 10배 희석하여 ammonia assay kit(AA100, Sigma, St. Louis, USA)를 이용하여 측정하였다.

7) 난황 내 지질 함량

Gas chromatography용 검출기로서 이용되는 수소염 이온화 검출기를 응용하여 chromatorod에 전개 분리시킨 후 발색 과정 없이 직접 검출해서 각 지질 함량을 측정하는 Iatroscan 분석법을 이용하였다.

Folch 등(1957)의 방법을 사용하여 시료 내에 Folch 용액(chloroform : methanol = 2 : 1, v/v)과 내부 표준 물질(cholesterol acetate 1 mg을 Folch용액 1 mL에 용해시킨 것)을 넣어 시료 내의 총 지질을 추출하였다. 추출액을 glass type microsyringe를 이용하여 chromatorod에 spotting하였다. 전개 용매(hexane : diethylether : formic acid = 60 : 10 : 0.1, v/v)에서 전개

시킨 후 IATRO SCAN(TH-10 TLC/FID analyzer, Iatro Ltd.)을 이용하여 각 지질의 함량을 분석하였다.

4. 통계 분석

모든 얻어진 결과에 대한 통계 분석은 Statistical Analysis System(SAS, 2002)의 General Linear Model(GLM) Program을 이용하여 실시하였고, 분산 분석상의 통계적인 유의차가 인정될 때 Duncan의 다중 검정을 이용하여 처리간의 유의성을 검정하였다(Duncan, 1955).

결과 및 고찰

1. 사료 섭취량, 난 생산성 및 조직의 상대적 중량에 미치는 영향

생균제와 colistin의 복합 첨가제의 급여가 사료 섭취량, 난 생산성, 난중 및 조직의 생체중 대비의 상대적 중량에 미치는 영향에 대한 결과를 Table 2에 나타내었다. 전 실험 기간 중 이들 측정치들의 평균을 통해 분석해 본 결과, Control과 각 처리구간에 통계적으로 유의성 있는 차이를 보이지 아니하였다. 평균 산란율은 T3 처리구가 83.77%로 가장 높았으나, Control과 다른 처리구간의 산란율에서는 통계적 유의성은 없었다. 난중, 일산란량 및 조직 중량의 결과에서도 처리간에 큰 차이는 없는 것으로 나타났다.

Nahahon 등(1994)은 산란계 사료 내 *Lactobacillus* spp.의 생균제의 급여는 산란계의 식욕을 촉진시키는 효과가 있다고 하였고, Xu 등(2006)도 산란계 사료 내 *Bacillus subtilis*의 급여가 적정 수준으로 급여했을 때 사료 섭취량이 다소 감소하는 결과가 관찰되었으나, 과도한 수준에서는 오히려 증가하는 경향을 나타내었다고 하였다. 하지만 Mahdavi 등(2005)

은 산란계 사료 내 *Bacillus* spp.의 생균제를 첨가한 실험에서 사료 섭취량과 사료 효율에 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. Tortuero와 Fernandez(1995) 및 Nahashon 등(1994)은 산란율과 난중이 유의하게 개선되었다고 보고하였고, 김상호 등(2002)도 *Lactobacillus* spp.의 첨가 급여가 산란율을 증가시켰다고 보고하였다. 그러나 단순 또는 복합 생균제의 산란계 사료 내 첨가 시 난중에 영향을 미치지 않았다는 보고도 상당수 있었다(Haddadin 등, 1996; Chen과 Chen, 2003).

이처럼 산란계 사료 내 생균제의 첨가로서 나타나는 생산성에 미치는 영향이 연구자에 따라 다르게 나타나는 경우가 빈번하다. Jin 등(1998)은 여러 생균제의 첨가에 따른 생산성에 미치는 영향의 차이는 첨가 균수의 차이 때문이라고 하였고, Mahdavi 등(2005)은 10^9 cfu/g 이상의 생균제의 첨가만이 난중의 증가에 영향을 미칠 수도 있다고 보고한 바 있다.

2. 난질 및 난각질에 미치는 영향

생균제와 *Aspergillus oryzae* 및 colistin의 복합 첨가제의 급여가 내부 난질 및 난각질에 미치는 영향에 대한 결과를 Table 3에 명시하였다. 난각 강도, 난각 두께 및 난각색과 같은 난각의 질에 있어서는 처리구 간에 통계적으로 유의성 있는 차이가 없었다. 그러나 난황색과 Haugh unit에 있어서는 유의성 있는 차이가 관찰되었다. 즉, 난황색은 Control과 T1 처리구에서 개선되는 결과가 관찰되었고($P<0.05$), Haugh unit은 처리구가 Control에 비해 유의하게 증가하거나 증가하는 경향이 나타났다($P<0.05$).

Tortuero와 Fernandez (1995)는 복합 생균제의 급여 후 난백 품질이 개선되었는데, 혈액 내 Ca와 P 및 미량 광물질 농도에서는 차이가 없었다고 하였다. Tortuero와 Fernandez(1995), Xu 등(2006)도 생균제의 급여가 난백 품질을 향상시킨다고

Table 2. Effects of feeding mixture of probiotics and colistin on performance and relative weight of liver and spleen in laying hens^{1,2}

	Control	T1	T2	T3
Feed intake (g/hen/day)	122.2 ± 2.61	123.2 ± 1.96	123.1 ± 2.65	126.1 ± 2.08
Egg production (%)	82.2 ± 0.59	82.5 ± 0.68	82.6 ± 0.71	83.7 ± 0.81
Egg weight (g/egg)	65.1 ± 0.48	65.1 ± 0.55	65.0 ± 0.52	65.1 ± 0.41
Egg mass	53.5 ± 0.52	53.6 ± 0.55	53.7 ± 0.61	54.5 ± 0.58
Liver (g/100g B.W.)	1.88 ± 0.08	1.8 ± 0.07	1.87 ± 0.07	2.08 ± 0.12

¹ Control, probiotics and antibiotics free; T1, *Bacillus subtilis*+*Aspergillus oryzae*+*Lactobacillus plantarum*; T2, *Bacillus subtilis*+*Aspergillus oryzae*; T3, *Bacillus subtilis*+*Aspergillus oryzae*+colistin.

² Mean±SE.

보고하기도 하였으나, 생균제 첨가에 따른 난백 품질 향상의 원인에 관한 정확한 기전은 정확히 아직 밝혀진 바 없다(Mahdavi 등, 2005).

Panda 등(2003)은 산란기에 생균제를 급여했을 때 난각의 무게와 난각 두께 등 난각질을 개선시킨다고 보고하였으며, Nahashon 등(1996)은 사료 내 생균제 급여가 난각질과 난황색이 유의적으로 증가한다고 보고하였다. Rovinson(1997)은 *Lactobacillus* 첨가 시 분비된 lactic acid가 Ca과 P의 흡수를 증진시켜 난각질의 개선 효과가 있다고 하였다. 하지만 Chen과 Chen(2003), Haddadin 등(1996) 및 Mahdavi 등(2005)은 사료 내 생균제의 급여가 난각 강도와 난각 두께에 미치는 영향이 없다고 하였다. Mohan 등(1995)은 10주간 생균제의 급여 시 난각질 개선 효과가 부분적으로 나타났다고 보고하였다.

본 실험 결과, 생균제와 colistin의 복합 첨가제의 급여는 난백 품질을 개선시켰으며, 난각질에는 영향을 미치지 않았다. 본 첨가제 급여로 말미암아 난황색에 부정적(T2, T3)인 결과가 나타난 점과 Haugh unit가 증가된 점은 본 실험 설계나 사

료 원료 구성으로 보아 설명하기 어려우며, 추후 반복 실험을 통한 깊이 있는 연구가 필요하다고 사료된다.

3. 혈액 콜레스테롤 농도와 간 기능 관련 효소의 활성화에 미치는 영향

산란계 사료 내 본 복합 첨가제의 급여가 혈액 콜레스테롤 농도와 간 기능 관련 효소의 활성화에 미치는 영향을 Table 4에 나타내었다. 혈중 총 콜레스테롤 농도와 HDL 콜레스테롤의 농도는 수치상으로는 감소하는 경향을 나타내었으나, 통계적으로 유의한 차이는 아니었다. 총 콜레스테롤과 HDL 콜레스테롤의 비율로 보아 처리구간 차이는 나타나지 않았다. 혈중 GOT 및 GPT 수준에도 생균제 첨가에 따른 차이가 없는 것으로 나타났다.

본 연구 결과와는 달리 김용란 등(2000)은 육계 사료 내 복합 생균제를 급여했을 때 혈중 총 콜레스테롤 농도가 유의하게 감소되었다고 하였고, 유선중(2007)은 산란계 사료 내 복합 생균제의 급여가 혈중 콜레스테롤 농도의 저하에

Table 3. Effects of feeding mixture of probiotics and colistin on egg quality in laying hens^{1,2}

	Control	T1	T2	T3
Eggshell strength (kg/cm ²)	3.13 ± 0.06	2.99 ± 0.60	3.07 ± 0.06	3.00 ± 0.05
Eggshell thickness (mm/100)	35.44 ± 0.21	34.40 ± 0.24	35.23 ± 0.26	34.35 ± 0.33
Egg shell color (S.C)	31.27 ± 0.48	31.13 ± 0.54	30.72 ± 0.44	31.58 ± 0.50
Egg yolk color (R.C.F)	7.54 ± 0.06 ^a	7.49 ± 0.53 ^{ab}	7.32 ± 0.04 ^b	7.33 ± 0.05 ^b
Haugh unit	89.25 ± 0.72 ^b	91.13 ± 0.67 ^{ab}	91.88 ± 0.65 ^a	92.23 ± 0.71 ^a

¹ Control, probiotics and antibiotics free; T1, *Bacillus subtilis*+*Aspergillus oryzae*+*Lactobacillus plantarum*; T2, *Bacillus subtilis*+*Aspergillus oryzae*; T3, *Bacillus subtilis*+*Aspergillus oryzae*+colistin.

² Mean ± SE.

^{ab} Values with different superscript were significantly differ ($P < 0.05$).

Table 4. Effects of feeding mixture of probiotics and colistin on blood profiles in laying hens^{1,2}

	Control	T1	T2	T3
Total cholesterol (mg/100 mL)	121.38 ± 10.20	118.52 ± 11.92	117.47 ± 10.84	102.52 ± 11.86
HDL cholesterol (mg/100 mL)	26.25 ± 2.02	24.18 ± 1.26	24.52 ± 1.51	23.31 ± 1.13
HDL cholesterol /total-C	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.24 ± 0.02
GOT (U/100 mL)	183.87 ± 4.61	206.12 ± 5.16	198.37 ± 11.46	187.63 ± 4.92
GPT (U/100 mL)	17.25 ± 1.06	18.01 ± 0.92	17.56 ± 0.42	17.17 ± 1.32

¹ Control, probiotics and antibiotics free; T1, *Bacillus subtilis*+*Aspergillus oryzae*+*Lactobacillus plantarum*; T2, *Bacillus subtilis*+*Aspergillus oryzae*; T3, *Bacillus subtilis*+*Aspergillus oryzae*+colistin.

² Mean ± SE.

효과가 있었다고 하였다. *Lactobacillus* spp.를 급여한 다른 연구에서도 혈청 콜레스테롤 수준이 유의하게 감소하는 결과가 보고되었다(Jin 등, 1998). 이는 아마도 균종 및 첨가량의 차이에 따라 변할 수 있을 것으로 사료된다. 혈중 콜레스테롤의 저하는 생균제가 위장관계에서 콜레스테롤의 흡수와 합성을 저하시키는데 기인하거나(Mohan 등, 1995), 대사과정 중 위장관계의 콜레스테롤을 이용하여 흡수를 저해시키기 때문이다(Nelson과 Gilliland, 1984). Abdulrahim 등(1996)은 생균제의 첨가는 미생물의 효소 작용으로 인해 장관 내 담즙산염이 deconjugation되며 이로 인해 콜레스테롤 배설이 증가하여 혈액 내 콜레스테롤을 낮춘다고 보고하였다. 그러나 Grunewald와 Michell(1983)은 쥐에게 *L. acidophilus* 급여 후에 혈중 콜레스테롤 농도에서 변화가 없었다고 하였고, Gill과 Guarner(2004)는 생균제가 사람의 혈중 콜레스테롤의 저하에 영향을 미친다는 결과에 대해서는 여전히 명확한 결론을 내리기 어렵다고 하였다.

혈중 GOT 및 GPT 활성은 대사 장애 등에 의한 조직의 손상을 반영하며(Lumeij, 1997), 새로운 사료 원료나 첨가제의 이용 시 안전성을 위한 지표가 된다(Diaz, 2003). 혈중 GOT와 GPT 수준에 영향을 미치지 않는 것으로 보아 복합 균종의 생균제의 급여가 산란계의 대사 생리에 이상을 초래하지

않는 것으로 판단되었다.

4. 맹장 내 암모니아 농도와 미생물 균총 및 분내 미생물 균총에 미치는 영향

맹장 내 암모니아 농도와 미생물 균총 및 분내 미생물 균총에 미치는 영향을 Table 5에 나타내었다. 맹장 내 암모니아 농도는 Control에 비해 T1 처리구와 T3 처리구에서 유의하게 감소하는 것으로 나타났다($P<0.05$). 총 세균수는 맹장 및 분내 모두 Control과 처리구간 유의성 있는 차이가 없는 것으로 나타났다. 한편, lactic acid bacteria의 경우 Control에 비해 처리구에서 일관성 있게 높은 경향을 보여주었고, 맹장 및 분내의 *coli* forms은 Control에 비해 처리구가 유의하게 낮거나($P<0.05$) 낮은 경향이 관찰되었다.

Yeo와 Kim(1997)은 가금에 있어서 *Lactobacillus* spp.의 급여는 소장의 urease activity를 감소시킨다고 하였고, Santos 등(1999)은 육계에 *Bacillus subtilis*의 급여가 영양소 소화율과 이용성을 높여 질소의 배설량을 감소시킴으로서 암모니아의 발생량을 줄이는 효과가 있다고 하였다. 김해진 등(2005)도 *Bacillus subtilis*의 첨가가 분내 암모니아태 질소 함량을 유의적으로 감소시켰다고 보고한 바 있다.

육계 사료 내 *Lactobacillus* spp.의 생균제 급여시 *coli* forms

Table 5. Effects of feeding mixture of probiotics and colistin on intestinal ammonia concentrations, cecal and fecal microflora in laying hens^{1,2}

	Control	T1	T2	T3
----- μ g/mL -----				
Ammonia concentration	1.24 \pm 0.03 ^a	0.97 \pm 0.01 ^b	1.20 \pm 0.02 ^a	0.95 \pm 0.05 ^b
----- log cfu/g -----				
Cecal microflora				
Total microbes	8.33 \pm 0.11	8.42 \pm 0.15	8.88 \pm 0.04	8.30 \pm 0.11
Lactic acid bacteria	8.44 \pm 0.41	9.11 \pm 0.20	9.22 \pm 0.23	8.77 \pm 0.29
<i>Coli</i> forms	6.30 \pm 0.15 ^a	5.81 \pm 0.17 ^b	6.33 \pm 0.12 ^a	5.53 \pm 0.17 ^b
Fecal microflora				
Total microbes	6.95 \pm 0.15	6.82 \pm 0.14	7.00 \pm 0.14	7.28 \pm 0.13
Lactic acid bacteria	7.10 \pm 0.14	7.52 \pm 0.11	7.47 \pm 0.13	7.53 \pm 0.15
<i>Coli</i> forms	5.66 \pm 0.13 ^a	5.12 \pm 0.14 ^{bc}	5.31 \pm 0.16 ^{ab}	4.80 \pm 0.16 ^c

¹ Control, probiotics and antibiotics free; T1, *Bacillus subtilis*+*Aspergillus oryzae*+*Lactobacillus plantarum*; T2, *Bacillus subtilis*+*Aspergillus oryzae*; T3, *Bacillus subtilis*+*Aspergillus oryzae*+colistin.

² Mean \pm SE.

^{a-c} Values with different superscript were significantly differ ($P<0.05$).

등의 유해균의 군수가 감소했다는 다수의 연구 결과가 있었으며(Tortuero, 1973; Jin 등, 1998), Han 등(1999)은 산란계 사료 내 *Aspergillus oryzae*의 급여는 *Lactobacillus*의 증가와 *coli forms*가 유의적 감소가 있었다고 하였다. 김용란 등(2000)은 육계사료 내 복합 생균제의 급여가 장 내 *coli forms* 박테리아를 감소시킨다고 보고하였고, 유선중(2007)은 산란계 사료 내 복합 생균제의 급여가 lactic acid bacteria를 증가시켰다고 보고하였다. 그러나 Jin 등(1998)은 *Lactobacillus* 배양물의 급여가 맹장과 소장 내 총균, 총혐기균 및 *Streptococci* 수준에 영향을 미치지 않았으며, *Lactobacilli* 수준에서도 유의한 차이가 없었다는 상반된 결과를 보고하였다. 또한, Jin 등(1998)은 이러한 상반된 결과는 생균제의 종류와 첨가 수준 및 환경의 차이에서 기인하는 것이라 하였고, Lesson과 Major(1990)는 오직 가축이 스트레스 환경에 놓여있을 때 *coli forms*의 증가에 대한 생균제의 효과를 볼 수 있다고 하였다. Colistin은 그람 음성 균의 세포막에 특이적으로 작용하여 병원균인 *E. coli*와 *Salmonella*를 효과적으로 감소시킨다고 보고하였다(van Hattum 등, 2000).

본 연구 결과 생균제와 colistin의 복합 첨가제의 급여는 맹장 내 암모니아 농도를 감소시켰으며, 이는 요소를 분해하는 미생물의 감소와 질소 이용률 개선 등에 의한 것으로 사료된다. 사료 내 생균제와 colistin의 복합 첨가제의 급여에 따라 장과 분 내에 *coli forms* 등이 유의하게 감소하는 결과를 나타내었다. 이는 생균제의 길항 작용과 항생제인 colistin에

의한 유의한 효과로 판단된다.

6. 난황 내 지질 함량 및 콜레스테롤 함량에 미치는 영향

산란계 사료 내 생균제와 colistin의 복합 첨가제의 급여가 난황 내 각 지질 분획 함량 및 콜레스테롤 함량에 미치는 영향에 대해 Table 6에 나타내었다. 4주차에는 Control에서 난황 내 콜레스테롤이 13.82 mg/g으로 가장 높았으며, T1이 11.86 mg/g, T2가 12.81 mg/g, T3가 10.43 mg/g으로 유의하게 낮거나($P<0.05$) 낮은 경향이 나타났으며, 8주차의 난황 콜레스테롤 농도는 Control에서 13.29 mg/g으로 가장 높았으며, 처리구가 약 11~12 mg/g으로 유의하게 감소하였다($P<0.05$). 난황 중성지질과 인지질의 농도는 Control과 처리구간의 차이는 없는 것으로 나타났다.

일부 선행 연구에서 산란계 사료 내 *Lactobacillus spp.*의 첨가가 난황 콜레스테롤 수준을 유의하게 감소시켰다는 결과가 관찰되었으며(Haddadin 등, 1996; Abdulrahim 등, 1996), Xu 등(2006)과 유선중(2007)은 *Bacillus subtilis* 급여 시 계란 콜레스테롤이 감소하는 결과를 보고하였다. Mahdavi 등(2005)과 Kurtoglu 등(2004)도 산란계 사료 내 복합 생균제의 급여는 혈장 콜레스테롤과 중성 지질이 감소하고 난황 내 콜레스테롤 수준이 감소한다고 하였다.

본 연구 결과, 난황 콜레스테롤은 Control에 비해 처리구가 감소하는 결과를 나타내었으며($P<0.05$), 난황 중성지질과 인지질은 처리구간에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 난황

Table 6. Effects of feeding mixture of probiotics and colistin on the concentrations of various lipid fractions of egg yolk^{1,2}

	Control	T1	T2	T3
	----- mg/g egg yolk-----			
4 weeks				
Cholesterol	13.82 ± 0.82 ^a	11.86 ± 1.30 ^{ab}	12.81 ± 0.24 ^a	10.43 ± 0.35 ^b
Triacylglycerol	197.2 ± 3.73	190.5 ± 7.47	195.8 ± 8.36	198.6 ± 7.36
Phospholipid	77.56 ± 5.36	78.71 ± 4.11	78.19 ± 2.84	79.85 ± 2.66
8 weeks				
Cholesterol	13.29 ± 0.38 ^a	11.77 ± 0.31 ^b	12.16 ± 0.30 ^b	11.78 ± 0.51 ^b
Triacylglycerol	210.1 ± 6.27	194.40 ± 4.20	201.38 ± 5.47	199.5 ± 4.46
Phospholipid	81.01 ± 2.78	80.16 ± 3.47	80.46 ± 2.11	82.21 ± 2.87

¹ Control, probiotics and antibiotics free; T1, *Bacillus subtilis*+*Aspergillus oryzae*+*Lactobacillus plantarum*; T2, *Bacillus subtilis*+*Aspergillus oryzae*; T3, *Bacillus subtilis*+*Aspergillus oryzae*+colistin.

² Mean ± SE.

^{ab} Values with different superscript were significantly differ ($P<0.05$).

콜레스테롤의 농도는 생균제의 첨가에 따라 감소한 것으로 관찰되었으며, 이는 선행 연구의 결과들과 일치하는 결과 (Mahdavi 등, 2005; Kurtoglu 등, 2004; Abdulrahim 등, 1996)로서 추후 저콜레스테롤 계란 생산을 위한 원료로서의 활용 가능성이 시사되었다.

적 요

본 연구는 산란계에 *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*와 *Aspergillus oryzae* 및 colistin의 복합 첨가제를 급여하였을 때 난 생산성과 난질 및 난각질에 미치는 영향과 장내 미생물 조성, 계분 암모니아 발생량 및 난황 내 콜레스테롤 함량에 미치는 영향을 함께 조사하였다. 50주령의 Hy-Line Brown 산란계 160수를 공시하여 일반 사료(Control) 또는 0.2% 복합균종 생균제를 함유하는 실험 사료(T1, *Bacillus subtilis* + *Aspergillus oryzae* + *Lactobacillus plantarum*; T2, *Bacillus subtilis* + *Aspergillus oryzae*; T3, *Bacillus subtilis* + *Aspergillus oryzae* + colistin)를 8주간 급여하였다. 사료 섭취량, 난 생산성 및 간의 중량 그리고 난각 강도, 난각 두께, 난각색은 처리구 간 유의성 있는 차이가 관찰되지 아니하였다. 그러나 Haugh unit는 처리구가 Control에 비해 유의하게 높았다($P < 0.05$). 혈 중 총 콜레스테롤 농도와 HDL 콜레스테롤은 Control에 비해 모든 처리구에서 감소하는 경향이 관찰되었으나 통계적 유의차는 없었다. 맹장 내 암모니아 농도에 미치는 영향은 Control에 비해 T1 처리구와 T3 처리구에서 유의하게 감소하는 것으로 나타났다($P < 0.05$). 총 균수와 lactic acid bacteria는 맹장 및 분내 모두 Control과 처리구 간 큰 차이가 없었고, 맹장 및 분내의 *coli* forms는 Control에 비해 복합 생균제 처리구가 유의하게 낮거나($P < 0.05$) 낮은 경향이 관찰되었다. 4주차와 8주차의 난황 콜레스테롤 농도는 복합 생균제 처리구가 Control에 비해 유의하게 감소하거나 감소하는 경향이 나타났다($P < 0.05$). 난황 중성지방과 인지질의 농도는 Control과 처리구 간의 차이는 없는 것으로 나타났다.

결론적으로 본 실험을 통해서 생균제인 *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae* 그리고 항생제인 colistin으로 이루어진 복합제의 급여는 생산성과 혈액 성상에 부정적인 영향이 없이 난황 콜레스테롤과 분내 암모니아 농도를 감소시키고, 장내 *coli* forms를 저하시키는 결과가 관찰되었다. Colistin이라는 항생제는 생균제의 활성화에 부정적인 영향 없이 생균제로만 이루어진 첨가제와 같은 효과를 내었으며, 장내 미생물 균총 조절에는 보다 효과적으로 작용

하는 것으로 나타났다. 따라서 복합 생균제를 급여함으로써 장내 균총과 산란계 사양에 유의한 효과를 기대할 수 있으며, colistin의 병용도 생균제의 이점을 저해하지 않는 것으로 사료된다.

(색인어 : 생균제, 콜리стин, 난황 콜레스테롤, 장내 암모니아 농도, 산란계)

인용문헌

- Abdulrahim SM, Haddadin MSY, Hashlamoun EAR, Robinson RK 1996 The influence of *Lactobacillus acidophilus* and Bacitracin on layer performance of chickens and cholesterol content of plasma and egg yolk. Br Poult Sci 37:341-346.
- Catchpole CR, Andrews JW, Brenwald N, Wise R 1997 Assessment of the *in-vitro* activity of colistin sulphomethate sodium. J Antimicrob Chemother 39:255-260.
- Chen YC, Chen TC 2003 Effects of commercial probiotic or prebiotic supplementation on production, size and quality of hens egg. Poult Sci 82:330.
- Diaz GJ, Roldan LP, Cortes A 2003 Intoxication of *Crotalaria pallida* seeds to growing broiler chick. Vet Hum Toxicol 45:187-189.
- Duncan DB 1955 Multiple range and multiple F test. Biometric 11:1-4.
- Gill HS, Guarner F 2004 Probiotics and human health: A clinical perspective. Postgraduate Med J 80:516-526.
- Grunewald KK, Mitchell K 1983 Serum cholesterol levels in mice fed fermented and unfermented acidophilus milk. J Food Protect 46:315-318.
- Haddadin MSY, Abdulrahim SM, Hashlamoun EAR, Robinson RK 1996 The effect of *Lactobacillus acidophilus* on the production and chemical composition of hen's eggs. Poult Sci 75:491-494.
- Han SW, Lee KW, Lee BD, Sung CG 1999 Effect of feeding *Aspergillus oryzae* culture on fecal microflora, egg qualities, and nutrient metabolizabilities in laying hens. Asian-Aus J Anim Sci 12:417-421.
- Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Ali MA, Jalaudin S 1998 Effects of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. Anim Feed Sci Technol 70:197-209.

- Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S 1997 Probiotics in poultry: modes of action. *World's Poult Sci J* 53:351-368.
- Kurtoglu V, Kurtoglu F, Seker E, Coskun B, Balevi T, Polat ES 2004 Effect of probiotic supplementation on laying hen diets on yield performance and serum and egg yolk cholesterol. *Food Addit Contam* 21:817-823.
- Lesson S, Major D 1990 As biotechnology gains momentum Canadian researchers study need for feed criteria. *Feedstuffs* 62:23-30.
- Lumeij JT 1997 Avian Clinical Biochemistry. Pages 857-883 In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Kanebo JJ, Harvey JW, Bruss ML 5th Ed. Academic Press.
- Mahdavi AH, Rahmani HR, Pourreza J 2005 Effect of probiotic supplements on egg quality and laying hen's performance. *Int J Poult Sci* 4:488-492.
- Mee BJ 1984 The selective capacity of pig feed additives and growth promotants for coilform resistance in antimicrobials in agriculture. Woodbine M Ed. Butter Worths, London. 349-358.
- Mohan B, Kadirvel R, Natarajan A, Bhaskaran M 1996 Effect of probiotic supplementation on growth, nitrogen utilization and serum cholesterol in broilers. *Br Poult Sci* 37:395-401.
- Mohan B, Kadirvel R, Bhaskaran M, Natarajan A 1995 Effect of probiotic supplementation on serum/yolk cholesterol and on egg shell thickness in layers. *Br Poult Sci* 36:799-803.
- Nahashon SN, Nakaue HS, Mirosh LW 1996 Performance of Comb White Leghorn layers fed a diet with a live microbial during the growth and egg laying phases. *Anim Feed Sci Technol* 57:25-38.
- Nahashon SN, Nakaue HS, Mirosh LW 1994 Production variables and nutrient retention in single comb white Leghorn laying pullets fed diets supplemented with directfed microbials. *Poult Sci* 73:1699-1711.
- Nelson CR, Gilliland SE 1984 Cholesterol uptake by *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci* 67:50.
- NRC 1994 Nutrient requirements of poultry. 9th ed. National Academy Press. Washington D.C.
- Panda AK, Reddy MR, Rama Rao SV, Praharaj NK 2003 Production performance, serum/yolk cholesterol and immune competence of white Leghorn layer as influenced by dietary supplementation. *Trop Anim Health Prod* 35:85-94.
- Patterson JA, Burkholder KM 2003 Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult Sci* 82:627-631.
- Roudaut B 1989 Depletion of colistin in eggs following medication of laying hens. *Vet* 11:183-185.
- Rovinson RK 1997 Yogurt and health. *Br Nutr Foundation Bull* 21:191-194.
- Rowghani E, Akbarian A 2007 Effects of a probiotic and other feed additives on performance and immune response of broiler chicks. *Int J Poult Sci* 6:261-265, 51:399-404.
- Santoso U, Ohtani S, Tanaka K, Sakaida M 1999 Dried *Bacillus subtilis* culture reduced ammonia gas release in poultry house. *AAAP and Korean Society of Anim Nut* 12:806-809.
- SAS 2002 SAS User's guide. Statistics, Version 8. e., SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Timmerman HM, Koning CJ, Mulder L, Rombouts FM, Beynen AC 2004 Monostrain, multistrain and multispecies probiotics : A comparison of functionality and efficacy. *Int J Food Microbiol* 15:96:219-33.
- Tortuero F, Fernandez E 1995 Effects of inclusion of microbial cultures barley - based diet s fed to laying hens. *Anim Feed Sci Technol* 53:255-265.
- Tortuero F 1973 Influence of implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. *Poult Sci* 52: 197.203.
- van Hattum CP, De Kleyne J, Grintjes G 2000 Efficacy of amoxicillin/colistin in gastro-intestinal *E. coli* infections complicated with *Streptococcus suis* in weaned piglets. In: *Proceedings of the 8th EAVPT Congress, Jerusalem*.
- Xu CL, Ji C, Ma Q, Hao K, Jin ZY, Li K 2006 Effects of a dried *Bacillus subtilis* culture on egg quality. *Poult Sci* 85: 364-368.
- Yeo J, Kim K 1997 Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic, or Yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. *Poult Sci* 76:381.385.
- Ziv G 1981 Clonocal pharmacology of polymyxins. *J Amer Vet Med Assosiation* 179:711-715.
- 김상호 유동조 박수영 이상진 최철환 나재천 류경선 2002 산란계의 생산성, 영양소 소화율 분의 암모니아 발생량 및 장내 미생물 변화에 대한 유산균의 급여 효과. *한국가금학회지* 29:213-223.
- 김용란 안병기 김문수 강창원 2000 생균제(MS102)의 사료내 첨가가 육계 성적과 혈중 콜레스테롤, 소장 크기 및

장내 균총에 미치는 영향. 동물자원과학회지 42:849-858.
김해진 유종상 권오석 민병준 손경승 조진호 진영걸 김인호
2005 산란계에 *Bacillus subtilis*의 급여가 계란 품질, 혈액
성상 및 분내 암모니아태 질소 함량에 미치는 영향. 한국
가금학회지 32:9-14.

유선종 2007 사료 내 천연물질과 필수미량광물질 첨가에 의
한 저콜레스테롤 계란의 생산. 건국대학교 대학원 박사
학위논문.

(접수일자: 2008. 03. 12, 채택일자: 2008. 06. 23)