

최 종 보 고 서

최 종  
연구보고서

유효성분 함유 및 저 콜레스테롤  
고품질 계란의 생산

The Production of Low Cholesterol  
and High Quality Eggs  
Enriched with Beneficial Nutrients

건국대학교

농림부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유효성분 함유 및 저 콜레스테롤 고품질 계란의 생산에 관한 연구”  
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 5월 24일

주관연구기관명 : 건국대학교

총괄연구책임자 : 강 창 원

세부연구책임자 : 안 병 기

연 구 원 : 유 선 중

연 구 원 : 김 재 영

연 구 원 : 윤 지 연

연 구 원 : 박 상 설

연 구 원 : 이 보 근

연 구 원 : 김 용 란

# 요 약 문

## I. 제 목

유효성분 함유 및 저 콜레스테롤 고품질 계란의 생산

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

### 1) 기술적 측면

#### ● 저 콜레스테롤 계란 생산을 위한 학문적 기초 지식의 제공

- 저 콜레스테롤 계란이 한정적으로 시판되고 있지만, 감소 정도가 제품에 따라 균일하지 않고 분석 치에서 큰 변이를 나타내는 문제가 있음

- 계란 내 콜레스테롤 수준을 일정하게 저하시키기 위해서는 산란계의 콜레스테롤대사에 대한 기초 지식이 뒷받침되어야 함

- 콜레스테롤 생합성 및 이화 경로와 난포 리셉터(oocyte receptor)로의 전이 기전에 대한 국내 연구는 전무한 상태이며, 이러한 기전의 규명은 차후 유사 연구를 위한 기초 정보의 제공이란 면에서 의미가 있음

- 본 연구에서는 영양적, 사료적 처리에 의한 계란 콜레스테롤의 변화를 설명하기 위해 콜레스테롤 체내 합성 경로와 난포로의 전이 경로를 생화학적 및 분자생물학적 분석기법을 통해 조사할 계획임

#### ● 유효성분의 계란 내 전이 효율의 규명 및 미량영양성분 분석방법의 정립

- 계란의 기능성 강화에 있어서 콜레스테롤 저감 연구와 더불어 유효성분을 계란 내에 강화하는 연구도 중점적으로 수행됨

- 다른 농용동물에 비해 산란계는 유효성분의 생산물 내 전이가 매우 효율적인 동물 모델임

- 지방산, 지용성 비타민 및 일부 광물질은 계란 내 전이가 비교적 쉬운 영양성분으로 알려져 있지만, 섭취 수준 대비 이행효율, 충분한 이행까지 필요한 소요시간 및 withdrawal period에 대한 연구는 매우 한정적임

- 본 연구에서는 기능성 영양성분의 형태별, 사료 내 수준별 급여를 통해 이행효율을 조사함으로써 고부가가치 기능성 계란을 비용효율적으로 생산할 수 있는 계기를 만들고자 함

- 특히 계란 내 미량영양성분의 정확한 분석 방법을 정립함으로써 앞으로 영양성분 강화 계란의 성분 조사를 위한 측정지표를 제시할 수 있을 것으로 사료됨

## 2) 경제·산업적 측면

### ● 저비용 고효율 기능성 사료의 개발

- 현재 기능성 계란 생산을 위해서는 고가의 특화 사료를 구입 급여하기 때문에 소비자 가격이 높게 설정될 수밖에 없는 구조임

- 콜레스테롤 저감 계란 및 영양성분 강화 계란의 생산을 위해 본 연구에서 시험할 원료들을 활용할 경우 현재보다 비교적 저렴한 기능성 사료(사료 kg당 10-15원 정도의 원가 상승 예상)의 생산이 가능할 것으로 판단됨

### ● 농가 소득 증대

- 현재 유통되는 저 콜레스테롤 계란은 일반계란에 비해 약 2-3배 (2,750원/10개), 고가로 팔리고 있으며, 1일 판매량 역시 20,000개로 매우 제한적이며, 따라서 농가에서 기능성 계란의 생산을 통해 얻는 부가가치는 그리 높지 않음

- 저비용 투입으로 보다 많은 양의 기능성 계란을 생산한다면 양계농가의 소득이 증대될 수 있음

## 3) 사회·문화적 측면

### ● 계란에 대한 소비자 인식의 제고

- 계란의 소비가 정체된 원인은 다양하지만, 계란 내 콜레스테롤 함량이 비교적 높다는 면이 큰 요인일 수 있음

- 특히 건강을 우선시하는 소비자에게 저 콜레스테롤 계란 및 유효영양성분이 효율적으로 강화된 계란의 공급은 계란에 대한 부정적인 이미지의 해소에 도움이 될 것으로 사료됨

- 최근 조류독감과 같은 악재로 계란의 소비가 격감하는 상황에서 계란의 새로운 소비를 창출하는 방법이 될 수 있음

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 사료 영양적 방법을 통한 저 콜레스테롤 계란 및 유효성분 함유 고품질 계란 생산을 위한 목적으로 수행하였다.

#### 1) 저 콜레스테롤 계란 생산을 위한 사료·영양 연구

- 실험 1에서는 미생물제 및 천연물질의 단독급여가 계란 콜레스테롤 함량에 미치는 영향을 조사하였다. 50주령의 Lohmann brown 산란계 250수를 공시하여 일반 사료 또는 1.0% 및 3.0% 마늘 분말과 0.3% 및 0.5% 생균제를 함유하는 실험사료를 8주간 급여하였다.

난생산성과 난질에서는 처리간에 큰 차이가 없었으나, 생균제 급여구에서 Haugh unit의 개선 효과가 관찰되었다. 마늘분말 급여구에서 생산된 계란 내 총 콜레스테롤 함량은 대조구에 비해 평균 13.5%에서 20%까지 감소하였으나, 처리간에 유의한 차이는 인정되지 않았다. VLDL receptor의 mRNA 발현에서는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

- 실험 2에서는 미생물제 및 유효광물질의 혼합급여가 계란 콜레스테롤 함량에 미치는 영향을 조사하였다. 53주령의 Hy-Line brown 산란계 210수를 공시하여 일반 사료 또는 올리고당, 생균제, 구리 및 셀레니움을 다양한 수준으로 혼합한 실험사료를 6주간 급여하였다.

난질과 난각질에서는 처리간에 큰 차이가 없었으며, GOT 및 GPT 활성에서도 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 생균제, 구리 및 셀레니움의 혼합급여에 의해 계란 내 총 콜레스테롤 함량은 평균 14.7%에서 23.5%까지 유의하게 감소하였다. HMG-CoA reductase의 mRNA 발현이 유의하게 저하되는 결과가 관찰되었다.

- 실험 3에서는 미생물제, 천연물질 및 유효광물질의 혼합급여가 계란 콜레스테롤 함량에 미치는 영향을 조사하였다. 60주령의 Hy-Line brown 산란계 280수를 공시하여 일반사료 또는 생균제, 마늘분말, 구리 및 셀레니움을 다양한 수준으로 혼합한 실험사료를 6주간 급여하였다.

사료섭취량 및 난 생산성에서는 큰 차이가 없었으나 Haugh unit가 개선되는 효과가 관찰되었다. 생균제, 마늘분말, 구리 및 셀레니움의 혼합급여에 의해 계란 내 총 콜레스테롤 함량은 평균 13.5%에서 29.8%까지 유의하게 감소하였다. HMG-CoA reductase 및 VLDL receptor mRNA 발현이 유의하게 저하되는 결과가 관찰되었다.

## 2) 유효성분 함유 고부가가치 계란 생산을 위한 연구

- 실험 1에서는 무기태 또는 유기태 셀레니움 및 구리의 첨가가 계란 내 셀레니움과 구리 함량에 미치는 영향을 조사하였다. 67주령 Lohmann brown 산란계 350수를 공시하여 일반사료 또는 유기태 및 무기태 셀레니움과 구리를 함유하는 실험사료를 5주간 급여하였다.

난 생산성과 난질에서는 처리간에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 사료 내 셀레니움 수준이 증가함에 따라 계란 내 셀레니움 함량 역시 증가하였으며, 유기태 셀레니움이 무기태에 비해 전이율이 다소 높은 것으로 나타났다. 구리의 공급 후에도 계란 내 구리 함량은 다소 증가하였으며 셀레니움에 비해서는 전이 효율이 낮았다. 계란의 관능적 특성에서는 처리간에 차이가 없는 것으로 나타났다.

- 실험 2에서는 라이코펜의 첨가형태가 계란 내 lycopene 함량에 미치는 영향을 조사하였다. 38주령 Hy-Line brown 산란계 160수를 공시하여 일반사료 또는 합성 라이코펜과 토마토 페이스트를 함유하는 실험사료를 총 6주간 급여하였다.

난각질에서는 처리간에 큰 차이가 없었으나 합성 라이코펜 급여구에서 난황색이 유의하게 개선되었다. 사료로서 공급한 합성 라이코펜이 계란내로 전이되는 결과가 확인되었다.

- 실험 3에서는 타우린과 카니틴의 첨가수준 및 첨가형태가 계란 내 타우린 및 카니틴 함량에 미치는 영향을 조사하였다. 50주령의 Hy-Line brown 산란계 240수를 공시하여 일반사료 또는 타우린 함유 원료, 합성 타우린 및 합성 카니틴을 함유하는 실험사료를 6주간 급여하였다. 타우린 및 카니틴 급여구에서 산란율이 유의하게 개선되었으나 타우린 급여구에서는 난중이 감소하는 경향을 나타내었다. 난각질에서는 처리간에 큰 차이가 없었다. 합성 타우린 0.04% 이상 급여구에서 계란 내 타우린 함량이 유의하게 증가하였다. 사료 내 카니틴 수준이 증가함에 따라 계란 내 카니틴 함량 역시 유의하게 증가하였다. 계란의 관능적 특성에서는 처리간에 차이가 없는 것으로 나타났다.

- 실험 4에서는 다양한 수준의 엽산 첨가가 계란 내 엽산 함량에 미치는 영향을 조사하였다. 52주령의 Hy-Line brown 산란계 120수를 공시하여 일반사료 또는 엽산을 다양한 수준으로 첨가한 실험사료를 6주간 급여하였다. 난 생산성과 난질에서는 처리간에 큰 차이가 없었으나 엽산 급여구에서 난황색이 유의하게 개선되었다. 사료 내 엽산 수준의 증가에도 불구하고 계란 내 엽산 함량은 증가하지 않았다. 계란의 관능적 특성에서는 처리간에 차이가 없는 것으로 나타났다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- 저 콜레스테롤 계란 생산 기술의 특허 출원
- 고품질 계란 생산을 위한 특화 사료의 생산 및 농가보급
- 기능성 계란 품질 평가를 위한 지표 제공
- 콜레스테롤 합성 및 이화 경로, 전이 기전의 기초자료 제공
- 얻어진 연구결과의 발표 및 논문화

## SUMMARY

### Part 1. Study on nutritional approach to produce the low cholesterol egg

Experiment 1 was conducted using 250 Lohmann Brown layers (50 week of age) to evaluate the dietary effects of probiotics and natural product on the content of egg yolk cholesterol. The layers were divided into five treatment groups and fed commercial diet or experimental diets containing 1.0%, 3.0% garlic powder or 0.3%, 0.5% probiotics for 8 weeks. No significant differences were observed among groups in egg production and egg qualities. Haugh unit in groups fed probiotics was significantly higher than that of control. The contents of egg yolk cholesterol in groups fed diet containing garlic powder were reduced by 13.5-20.0% as compared to that of control, but not significantly. The expression of VLDL receptor mRNA was not influenced by dietary treatment.

Experiment 2 was conducted using 210 Hy-Line Brown layers (53 week of age) to evaluate the effects of combination feeding of probiotics and essential trace minerals on the content of egg yolk cholesterol. The layers were divided into seven treatment groups and fed commercial diet or experimental diets containing oligosaccharide, probiotics, selenium and copper for 6 weeks. There were no significant differences in egg and eggshell qualities between groups. The contents of egg yolk cholesterol by combination feeding of probiotics, selenium and copper were significantly reduced by 14.7-23.5% as compared to that of control. The expression of HMG-CoA reductase mRNA was significantly decreased by dietary treatments.

Experiment 3 was conducted using 280 Hy-Line Brown layers (60 week of age) to evaluate the effects of combination feeding of probiotics, natural product and essential trace minerals on the content of egg yolk cholesterol. The layers were divided into seven treatment groups and fed commercial diet or experimental



diets containing probiotics, garlic powder, selenium and copper for 6 weeks. There was no significant difference in egg production between groups. Haugh unit in groups fed diets containing probiotics, natural product and essential trace minerals were significantly higher than that of control. The contents of egg yolk cholesterol by combination feeding of probiotics, garlic powder, selenium and copper were significantly reduced by 13.5-29.8% as compared to that of control. The expressions of HMG-CoA reductase and VLDL receptor mRNA were significantly decreased by dietary treatments.

Part 2. Study on the production of high quality egg enriched with beneficial nutrients

Experiment 1 was conducted using 350 Lohmann Brown layers (67 week of age) to evaluate the dietary effect of organic or inorganic selenium and copper on their transfer into eggs. The layers were divided into seven treatment groups and fed commercial diet or experimental diets containing organic or inorganic selenium and copper for 5 weeks. No significant differences were observed among groups in egg production and egg qualities. The contents of selenium levels were linearly increased as dietary selenium level increased for both sources, but selenium content from groups fed organic selenium slightly higher than that fed inorganic selenium. The sensory characteristics of eggs were not influenced by dietary treatments.

Experiment 2 was conducted using 160 Hy-Line Brown layers (38 week of age) to evaluate the dietary effect of supplemental types of lycopene on its transfer into eggs. The layers were divided into four treatment groups and fed commercial diet or experimental diets containing 10, 20 ppm synthetic lycopene or 1.7% tomato paste for 6 weeks. The yolk colors were significantly improved by dietary synthetic lycopene, although there were no significant differences in eggshell qualities and Haugh unit. The contents of lycopene in egg yolk and liver in groups fed synthetic lycopene were significantly higher than that of control group.

Experiment 3 was conducted using 240 Hy-Line Brown layers (50 week of age) to evaluate the dietary effect of supplemental levels of types of taurine and carnitine on their transfer into eggs. The layers were divided into eight treatment groups and fed commercial diet or experimental diets containing SLP, synthetic taurine or synthetic carnitine for 6 weeks. The egg weights in groups fed diets containing SLP or synthetic taurine tended to be reduced. No significant differences in eggshell qualities were observed among groups. The contents of taurine in groups fed diet containing synthetic taurine above 0.04% were significantly increased than that of control group. The contents of carnitine levels were linearly increased as dietary carnitine level increased. The sensory characteristics of eggs were not influenced by dietary treatments.

Experiment 4 was conducted using 120 Hy-Line Brown layer (52 week of age) to evaluate the dietary effect of various levels of folic acid on its transfer into eggs. The layers were divided into four treatment groups and fed commercial diet or experimental diets 2, 10, or 50 ppm folic acid for 6 weeks. The yolk colors in groups fed diets containing folic acid were significantly higher than that of control group, although there were no significant differences in egg production and egg qualities. The contents of folic acid in egg yolk were not increased by folic acid supplementation. No significant differences were observed among groups in the sensory characteristics

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	18
Part 1. Objectives of the study .....	18
Part 2. Outlines and needs for the study .....	20
Chapter 2. Present status of technological development in domestic and abroad .....	22
Chapter 3. Methods and Results of present research .....	26
Part 1. Study on nutritional approach to produce the low cholesterol egg .....	26
1. Dietary effects of probiotics and natural product on the content of egg yolk cholesterol (Exp. 1) .....	26
- Materials and Methods .....	26
- Results and discussion .....	32
2. Effects of combination feeding of probiotics and essential minerals on the content of egg yolk cholesterol (Exp. 2) .....	37
- Materials and Methods .....	37
- Results and discussion .....	43
3. Effects of combination feeding of probiotics, natural product and essential minerals on the content of egg yolk cholesterol (Exp. 3) .....	52
- Materials and Methods .....	52
- Results and discussion .....	56
Part 2. Study on the production of high quality egg enriched with beneficial nutrients .....	65

1. Dietary effect of organic or inorganic selenium and copper on their transfer into eggs (Exp. 1) .....	65
- Materials and Methods .....	65
- Results and discussion .....	71
2. Dietary effect of supplemental types of lycopene on its transfer into eggs (Exp. 2) .....	76
- Materials and Methods .....	76
- Results and discussion .....	79
3. Dietary effect of supplemental levels and types of taurine and carnitine on their transfer into eggs (Exp. 3) .....	85
- Materials and Methods .....	85
- Results and discussion .....	91
4. Dietary effect of various levels of folic acid on its transfer into eggs (Exp. 4) .....	98
- Materials and Methods .....	98
- Results and discussion .....	101
Chapter 4. Achievement and contribution of the study to industry .....	105
Chapter 5. Future plan for application of the study results .....	106
Chapter 6. New knowledges and information for the research topics .....	107
Chapter 7. References .....	109

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	18
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성 .....	18
제 2 절 연구개발의 내용 및 범위 .....	20
제 2 장 국내외 기술 개발 현황 .....	22
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 .....	26
제 1 절 저 콜레스테롤 계란 생산을 위한 사료·영양 연구 (제 1 세부과제) .....	24
1. 미생물제 및 천연물질의 단독급여가 계란 콜레스테롤 함량에 미치는 영향 (실험 1) .....	26
가. 재료 및 방법 .....	26
나. 결과 및 고찰 .....	32
2. 미생물제 및 유효광물질의 혼합급여가 계란 콜레스테롤 함량에 미치는 영향 (실험 2) .....	37
가. 재료 및 방법 .....	37
나. 결과 및 고찰 .....	43
3. 미생물제, 천연물질 및 유효광물질의 혼합급여가 계란 콜레스테롤 함량에 미치는 영향 (실험 3) .....	52
가. 재료 및 방법 .....	52
나. 결과 및 고찰 .....	56

제 2 절 유효성분 함유 고부가가치 계란생산을 위한 연구 (제 2 세부과제) .....	65
1. 무기태 또는 유기태 셀레늄 및 구리의 첨가가 계란 내 셀레늄 및 구리 함량 에 미치는 영향 (실험 1) .....	65
가. 재료 및 방법 .....	65
나. 결과 및 고찰 .....	71
2. Lycopene의 첨가 형태가 계란 내 lycopene 함량에 미치는 영향 (실험 2) .....	76
가. 재료 및 방법 .....	76
나. 결과 및 고찰 .....	79
3. 타우린 및 카니틴의 첨가 수준 및 첨가 형태가 계란 내 타우린 및 카니틴 함 량에 미치는 영향 (실험 3) .....	85
가. 재료 및 방법 .....	85
나. 결과 및 고찰 .....	91
4. 다양한 수준의 엽산 첨가가 계란 내 엽산 함량에 미치는 영향 (실험 4) .....	96
가. 재료 및 방법 .....	98
나. 결과 및 고찰 .....	101
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	105
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	106
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	107
제 7 장 참고문헌 .....	109

## List of Table

Table 1	The development of value-enhanced egg production	24
Table 2	The classification of value-enhanced eggs	25
Table 1-1	Experimental design	26
Table 1-2	Formula and chemical composition of the experimental diets	27
Table 1-3	Primer sequence of GAPDH and HMG-CoA reductase	31
Table 1-4	Effects of dietary probiotics and garlic powder on the feed intake, egg performances and liver weights of laying hens	32
Table 1-5	Effects of dietary probiotics and garlic powder on the egg and eggshell qualities in laying hens	33
Table 1-6	Effects of dietary probiotics and garlic powder on various blood profiles in laying hens	34
Table 1-7	Effects of dietary probiotics and garlic powder on contents of egg cholesterol in egg yolk of laying hens	35
Table 1-8	Effects of dietary probiotics and garlic powder on the change of Haugh unit during storage at room temperature	36
Table 2-1	Experimental design	37
Table 2-2	Formula and chemical composition of the experimental diets	38
Table 2-3	Analytical conditions of IATRO SCAN	41
Table 2-4	The contents of each component in standard solution	42
Table 2-5	Primer sequence of GAPDH, HMG-CoA reductase, VLDL receptor for real-time PCR	42
Table 2-6	Real-time cycler conditions for the lightcycler system	42
Table 2-7	Combination feeding of oligosaccharide, probiotics, copper and selenium on feed intake and laying performances in laying hens	44
Table 2-8	Combination feeding of oligosaccharide, probiotics, copper and selenium on egg and eggshell qualities in laying hens	45
Table 2-9	Combination feeding of oligosaccharide, probiotics, copper and selenium on various blood profiles in laying hens	47
Table 2-10	Combination feeding of oligosaccharide, probiotics, copper and selenium on contents of cholesterol, triacylglycerol and phospholipid of egg in laying hens	49
Table 3-1	Experimental design	51
Table 3-2	Formula and chemical composition of experimental diets	53
Table 3-3	Primer sequence of GAPDH, HMG-CoA reductase, Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase and VLDL receptor for real-time PCR	55

Table 3-4 Real-time cycler conditions for the lightcycler system	56
Table 3-5 Combination feeding of LAB, garlic extract, copper and selenium on feed intake, egg production and liver weight in laying hens	57
Table 3-6 Combination feeding of LAB, garlic extract, copper and selenium on egg and eggshell qualities in laying hens	57
Table 3-7 Combination feeding of LAB, garlic extract, copper and selenium on various blood profiles in laying hens	59
Table 3-8 Combination feeding of LAB, garlic extract, copper and selenium on contents of lipid fractions of egg in laying hens	61
Table 3-9 Combination feeding of LAB, garlic extract, copper and selenium on intestinal microflora in laying hens	62
Table 1-1 Experimental design	65
Table 1-2 Formula and chemical composition of experimental diets	66
Table 1-3 Analytical condition of HPLC for copper	68
Table 1-4 Analytical condition of HPLC for selenium	69
Table 1-5 Effects of dietary Se and Cu on feed intake, egg production and liver weight in laying hens	71
Table 1-6 Effects of dietary Se and Cu on egg and eggshell qualities in laying hens	72
Table 1-7 Effects of dietary Se and Cu on various blood profiles in laying hens	73
Table 1-8 Effects of dietary Se and Cu on the their transfer into eggs in laying hens	74
Table 1-9 Effects of dietary Se and Cu on sensory evaluation of eggs in laying hens	75
Table 2-1 Experimental design	76
Table 2-2 Formula and chemical composition of experimental diets	77
Table 2-3 Effects of dietary supplementation of lycopene and tomato paste on feed intake, egg performances and liver weight in laying hens	80
Table 2-4 Effects of dietary supplementation of lycopene and tomato paste on eggshell strength, eggshell thickness, and Haugh unit in laying hens	81
Table 2-5 Effects of dietary supplementation of lycopene and tomato paste on yolk color in laying hens	81
Table 2-6 Effects of dietary supplementation of lycopene and tomato paste on various blood profiles in laying hens	82



Table 2-7	Effects of dietary supplementation of lycopene and tomato paste on egg Haugh unit during storage at room temperature	84
Table 2-8	Effects of dietary supplementation of lycopene and tomato paste on lycopene concentration of egg yolk and liver in laying hens	84
Table 3-1	Experimental design	85
Table 3-2	Formula and chemical composition of experimental diets	86
Table 3-3	Analytical conditions of IATRO SCAN	90
Table 3-4	The contents of each component in standard solution	90
Table 3-5	Effects of dietary taurine byproduct, synthetic taurine, and synthetic carnitine on feed intake and laying performances in laying hens	92
Table 3-6	Effects of dietary taurine byproduct, synthetic taurine, and synthetic carnitine on egg qualities in laying hens	92
Table 3-7	Effects of dietary taurine byproduct, synthetic taurine, and synthetic carnitine on various blood profiles in laying hens	94
Table 3-8	Effect of dietary taurine byproduct and synthetic taurine on the contents of taurine of the serum and egg yolk in laying hens	94
Table 3-9	Effect of dietary carnitine on the contents of carnitine of egg yolk in laying hens	95
Table 3-10	Effects of dietary taurine byproduct, synthetic taurine, and synthetic carnitine on the contents of various lipid fractions of egg yolks in laying hens	97
Table 3-11	Effects of dietary taurine byproduct, synthetic taurine, and synthetic carnitine on sensory evaluation of egg in laying hens	97
Table 4-1	Experimental design	99
Table 4-2	Formula and chemical composition of experimental diets	99
Table 4-3	Effects of dietary folic acids on feed intake and laying performances in laying hens	101
Table 4-4	Effects of dietary folic acids on egg and eggshell qualities in laying hens	102
Table 4-5	Effects of dietary folic acids on the contents of folic acid of eggs in laying hens	103
Table 4-6	Effects of dietary folic acids on various blood profiles in laying hens	103
Table 4-7	Effects of dietary folic acids on the contents of various lipid fractions of egg yolks in laying hens	104
Table 4-8	Effects of dietary folic acids on sensory evaluation of egg in laying hens	104

## List of Figure

Figure 1-1 Expressions of HMG-CoA reductase and VLDL receptor mRNA	35
Figure 2-1 Relative levels of HMG-CoA reductase gene expression	50
Figure 2-2 Relative levels of VLDL receptor gene expression	51
Figure 3-1 Relative levels of liver HMG-CoA reductase gene expression	63
Figure 3-2 Relative levels of liver Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene expression	64
Figure 3-3 Relative levels of liver VLDL-receptor gene expression.	64

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 기술적 측면

#### 가. 저 콜레스테롤 계란 생산을 위한 학문적 기초 지식의 제공

현재 시중에는 저 콜레스테롤 계란이 한정적으로 시판되고 있지만, 감소 정도가 제품에 따라 균일하지 않고 분석 치에서 큰 변이를 나타내는 문제가 있다. 계란 내 콜레스테롤 수준을 일정하게 저하시키기 위해서는 산란계의 콜레스테롤대사에 대한 기초 지식이 뒷받침되어야 한다. 산란계에 대한 콜레스테롤 생합성 및 이화 경로와 난포 리셉터(oocyte receptor)로의 전이 기전에 대한 국내 연구는 전무한 상태이며, 이러한 기전의 규명은 차후 유사 연구를 위한 기초 정보의 제공이란 면에서 의미가 있다. 따라서 본 연구에서는 영양적, 사료적 처리에 의한 계란 콜레스테롤의 변화를 설명하기 위해 콜레스테롤 체내 합성 경로와 난포로의 전이 경로를 생화학적 및 분자생물학적 분석기법을 통해 조사할 계획이다.

#### 나. 유효성분의 계란 내 전이 효율의 규명 및 미량영양성분 분석방법의 정립

계란의 기능성 강화에 있어서 콜레스테롤 저감 연구와 더불어 유효성분을 계란 내에 강화하는 연구도 증점적으로 수행되고 있으며, 다른 농용동물에 비해 산란계는 유효성분의 생산물 내 전이가 매우 효율적인 동물 모델이다. 산란계에서의 지방산, 지용성 비타민 및 일부 광물질은 계란 내 전이가 비교적 쉬운 영양성분으로 알려져 있지만, 섭취 수준 대비 이행효율, 충분한 이행까지 필요한 소요시간 및 withdrawal period에 대한 연구는 매우 한정적이다. 이에 본 연구에서는 기능성 영양성분의 형태별, 사료 내 수준별 급여를 통해 이행효율을 조사함으로써 고부가가치 기능성 계란을 비용·효율적으로 생산할 수 있는 계기를 만들고자 한다. 특히 계란 내 미량영양성분의 정확한 분석 방법을 정립함으로써 앞으로 영양성분 강화 계란의 성분 조사를 위한 측정지표를 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

### 2. 경제·산업적 측면

#### 가. 저비용 고효율 기능성 사료의 개발

현재 기능성 계란 생산을 위해서는 고가의 특화 사료를 구입 급여하기 때문에 소비자 가격이 높게 설정될 수밖에 없는 구조이다. 그러나 콜레스테롤 저감 계란 및

영양성분 강화 계란의 생산을 위한 본 연구에서 시험할 원료들을 활용할 경우 현재보다 비교적 저렴한 기능성 사료(사료 kg당 10-15원 정도의 원가 상승 예상)의 생산이 가능할 것으로 판단된다.

#### 나. 농가 소득 증대

시중에 유통되는 저 콜레스테롤 계란은 일반계란에 비해 약 2-3배 (2,750원/10개), 고가로 팔리고 있으며, 1일 판매량 역시 20,000개로 매우 제한적이며, 따라서 농가에서 기능성 계란의 생산을 통해 얻는 부가가치는 그리 높지 않다. 이에 따라 저비용 투입으로 보다 많은 양의 기능성 계란을 생산한다면 양계농가의 소득이 증대될 수 있을 것이다.

### 3. 사회·문화적 측면

#### 가. 계란에 대한 소비자 인식의 제고

계란의 소비가 정체된 원인은 여러 가지 이유로 다양하지만, 계란 내 콜레스테롤 함량이 비교적 높다는 면이 큰 요인일 수 있다. 특히 건강을 우선시하는 소비자에게 저 콜레스테롤 계란 및 유효영양성분이 효율적으로 강화된 계란의 공급은 계란에 대한 부정적인 이미지의 해소에 도움이 될 것으로 사료된다. 최근 조류독감과 같은 악재로 계란의 소비가 격감하는 상황에서 부담없는 가격의 기능성 계란은 계란의 새로운 소비를 창출하는 방법이 될 수 있을 것이다.

## 제 2 절 연구개발의 내용 및 범위

### 1. 저 콜레스테롤 계란 생산을 위한 사료·영양 연구

- 가. 미생물제, 천연물질 및 유효 광물질의 단일급여 및 혼합급여가 계란 콜레스테롤 수준에 미치는 영향 평가
- 나. 계란 콜레스테롤 저감과 관련된 생화학적, 분자생물학적 기전 규명
- 다. 콜레스테롤 저감을 위한 사료·영양적 처리가 산란계의 생산성에 미치는 영향 평가

- 가. 미생물제 및 천연물질의 단독급여 및 혼합급여가 계란 콜레스테롤 함량에 미치는 영향

- 1) 콜레스테롤 저하 효과가 기대하는 특허균주, plant extracts 및 마늘 등을 다양한 수준으로 단일급여 혹은 혼합급여함
- 2) 최소 8주 이상의 사양실험을 통해 난 생산성을 조사하며, 생산된 계란의 난질 및 난각질, 보존성 등을 평가
- 3) 계란 내 콜레스테롤의 경시적 변화(time-dependent change) 조사
- 4) 계란 콜레스테롤 저감과 관련된 생화학적, 분자생물학적 기전 규명
  - 가) 혈장 내 VLDL 및 비텔로제닌의 조성 조사
  - 나) Hepatic HMG-CoA reductase mRNA의 발현을 조사
  - 다) 난포 리셉터의 활성화 및 mRNA 발현을 조사

- 나. 미생물제 및 유효광물질의 혼합급여가 계란 콜레스테롤 함량에 미치는 영향

- 1) 콜레스테롤 저하 효과가 기대하는 특허균주와 구리 및 셀레늄과 같은 유효광물질을 다양한 수준으로 조합하여 혼합급여함
- 2) 최소 8주 이상의 사양실험을 통해 난 생산성을 조사하며, 생산된 계란의 난질 및 난각질, 보존성 등을 평가
- 3) 계란 내 콜레스테롤의 경시적 변화(time-dependent change) 조사
- 4) 계란 콜레스테롤 저감과 관련된 생화학적, 분자생물학적 기전 규명
  - 가) 혈장 내 VLDL 및 비텔로제닌의 조성 조사
  - 나) Hepatic HMG-CoA reductase mRNA의 발현을 조사
  - 다) 난포 리셉터의 활성화 및 mRNA 발현을 조사

- 다. 미생물제, 천연물질 및 유효광물질의 혼합급여가 계란 콜레스테롤 함량에 미치는 영향

- 1) 콜레스테롤 저하 효과가 기대하는 특허균주, plant extracts 및 마늘 구리 및

- 셀레늄과 같은 유효 광물질을 다양한 수준으로 조합하여 혼합급여함
- 2) 최소 8주 이상의 사양실험을 통해 난 생산성을 조사하며, 생산된 계란의 난질, 난각질, 보존성 및 관능검사 등을 평가
  - 3) 계란 내 콜레스테롤의 경시적 변화(time-dependent change) 조사
  - 4) 계란 콜레스테롤 저감과 관련된 생화학적, 분자생물학적 기전 규명
    - 가) 혈장 내 VLDL 및 비텔로제닌의 조성 조사
    - 나) Hepatic HMG-CoA reductase mRNA의 발현을 조사
    - 다) 난포 리셉터의 활성화 및 mRNA 발현을 조사
    - 라) 기타 콜레스테롤 이화 경로(7 $\alpha$ -hydroxylase 경로 및 담즙산 배설)의 조사

## 2. 유효성분 함유 고부가가치 계란 생산을 위한 연구

- 1) 유효광물질 및 기능성 영양성분의 첨가형태별, 첨가수준별 계란 내 이행효율 조사
- 2) 이들 성분의 최대 이행에 소요되는 기간 및 withdrawal 평가
- 3) 계란 내 유효광물질 및 기능성 영양성분 함량 측정을 위한 분석방법의 정립
- 4) 기능성 계란 생산을 위한 사료·영양적 처리가 산란계의 생산성에 미치는 영향 평가

### 가. 유효 광물질 (무기태, 유기태)의 첨가수준별 이행효율 조사

- 1) 셀레늄 및 구리의 첨가형태별(무기태, 유기태), 첨가수준별 이행효율 조사
- 2) 이들 성분의 최대 이행에 소요되는 기간 및 withdrawal 평가
- 3) 최소 8주 이상의 사양실험을 통해 난 생산성을 조사하며, 생산된 계란의 난질, 난각질, 보존성 및 관능검사 등을 평가

### 나. 생리활성물질의 첨가수준별 이행효율의 조사

- 1) Isoflavon 및 lycopene 등의 항산화 생리활성물질의 첨가형태 및 수준별 이행효율 조사
- 2) 이들 성분의 최대 이행에 소요되는 기간 및 withdrawal 평가
- 3) 난 생산성을 조사하며, 생산된 계란의 난질, 난각질, 보존성 관능검사 평가

### 다. 타우린, 카니틴 및 엽산의 첨가수준별 이행효율의 조사

- 1) 타우린 함유 부산물 또는 정제 타우린, 카니틴 및 엽산의 첨가수준별 이행효율 조사
- 2) 이들 성분의 최대 이행에 소요되는 기간 및 withdrawal 평가
- 3) 난 생산성을 조사하며, 생산된 계란의 난질, 난각질, 보존성 및 관능검사 평가

## 제 2 장 국내외 기술 개발 현황

### 1. 기능성 계란 생산기술 및 시장의 발달

기능성 계란 생산을 위한 기초이론은 이미 1930년대부터 알려지기 시작했다. 1930년도에 일본 가금영양학 자들이 산란사료에 요오드(iodine)를 높게 첨가하여 급여하면 이를 섭취한 닭이 낳은 계란에는 요오드 수준이 일반란보다 높게 나타난다고 보고했다. 그 후 1950-70 년대에 걸쳐 사료내 비타민이나 광물질수준과 계란내 이들 영양소 수준 사이에 높은 상관관계가 있음이 보고되었다(Table 1).

그러나 이러한 과학자들의 연구결과는 주로 우수한 종란 생산 및 부화기술 개발을 위해 쓰였으며, 이들이 식란 또는 산업원료로서 계란의 부가가치를 높이고 상품성을 높이는 데는 활용되지 아니하였다. 그 후 1976년 일본의 농산공업이 요오드가 강화된 계란을 "히카리(%)"라는 상품명으로 계란시장에 소개하였고 이러한 특수란 시장의 확대는 1988년에 일본에서 비타민 E가 강화된 "콜롬버스란"과 한국에서 "요오드란"과 "영양란" 등이 시장에 소개되면서부터였다. 이러한 특수란의 출현은 북미대륙에도 영향을 미쳐 1990년대에 들어서 미국과 캐나다 등지에서 요오드와 비타민 E 강화란(Heartland's Best)과 오메가-3 지방 산 강화 계란인 Designer Egg 등이 출시되었다. 1999 년도에는 CLA 강화란이 미국에서, 그리고 2002년에는 저콜레스테롤 계란이 한국 시장에 유통되기 시작했다.

이러한 기능성 계란의 출현에 앞서서 자연란, 유정란, 위생란 등의 부가가치를 높이기 위한 특수란 시장은 이미 "폴무원"이나 "오경농장"을 통해서 1984년도부터 이루어지기 시작했으나 이들은 생리활성 기능물질의 보장과는 다소 거리가 있는 일종의 특수란이었다.

### 2. 기능성 계란의 생산방법

계란내 기능성 물질의 특성을 기준으로 볼 때 크게 4가지로 구분하여 볼 수가 있다(Table 2).

첫째는 기능성 계란 생산기술 발달의 초기단계에서 볼 수 있는 것으로 인체에 결핍되기 쉬운 영양소, 즉 비타민이나 광물질 및 특수지방산이 강화된 영양란을 들 수 있으며 요오드란, 비타민 E 강화란 등이 있다.

두 번째는 면역항체가 강화된 면역항체 강화란으로 IgY 등 질병예방 기능을 가진 면역항체가 강화되었다. 대표적인 예가 위염을 유발시키는 것으로 알려진 헬리코박터 파일로리 면역항체 강화란이 있다.

세 번째는 영양소 이외의 생리적 기능활성물질, 즉 기능소가 강화된 기능소 강화

란이다. 이에 대해서는 아직 논란이 많으나 그만큼 많은 연구가 요구되는 분야이다.

끝으로 네 번째는 소비자들의 선호도가 낮은 생리물질의 계란내 함량을 낮춘 성분 저하란이며, 가장 대표적인 것이 계란내 콜레스테롤 함량을 낮춘 저콜레스테롤 계란의 생산이다.

이들의 생산 및 상품화를 위해서는 단순한 기술적인 연구뿐만 아니라 시장에서 소비자들의 구매욕구나 이를 필요로 하는 시장의 크기에 대한 연구가 생산에 선행되어야 할 것이다.

#### 가. 영양성분 강화

1) 비타민 : 장으로부터 흡수되어 체내에 저장된 대부분의 비타민은 계란 내로 쉽게 이행되는 경향이 있다. 이 중에서도 특히 지용성 비타민인 A, D, E의 이행효율이 높은 편이다. 그러나 비타민 A의 전구물질인 베타카로틴( $\beta$ -carotene)의 이행효율은 낮은 반면 수용성 비타민 중에도 티아민(비타민 B1), 리보플라빈(비타민 B2), 바이오틴(비타민 B12) 등의 이행정도가 높은 것으로 알려지고 있다. 이 중에서 현재 가장 널리 이용되고 있는 것은 계란내 비타민 A, E, B12의 함량을 높인 기능성 계란의 생산방법이다.

2) 광물질 : 필수광물 가운데 다량광물질(칼슘, 인, 유황, 나트륨, 염소, 칼륨)들은 계란내 이행이 쉽지 않은 반면 미량광물질인 요오드(I), 셀레늄(Se), 아연(Zn), 망간(Mn), 철분(Fe) 등은 이행율이 높은 편이다. 이 중에서 요오드와 셀레늄 강화란의 인기가 높다.

3) 특수지방산 강화 : 계란의 난황내 지방산 조성은 사료내 지방산 조성에 의해서 어느 정도 변화가 가능하다. 순환계 질병 예방에 도움이 되는 것으로 알려진 오메가-3 계열 지방산, 즉 리놀레닌산(linolenic acid : LNA), EPA(eicosapentaenoic acid), DHA(docosahexaenoic acid)의 강화란 생산은 이미 우리나라는 물론 세계 각지에서 널리 행해지고 있다. 1980년대 들어서 CLA(conjugated linoleic acid)가 항암 및 면역 강화기능을 지니고 있다는 것이 알려지자 미국과 일본에서 1999년부터는 CLA 강화 계란의 생산기술이 개발되었고, 2000년대에 들어서면서 상품화되었다. 2000년대에 들어서 수유기의 어린이용 분유제조에 필요한 아라키돈산(arachidonic acid) 강화란 생산기술이 개발되었다.

#### 나. 면역항체 강화

닭의 혈청 내에 있는 면역글로불린(immunoglobulin G, IgG)이 난황으로 이행되어 난황면역글로불린(IgY)이 된다. 이렇게 해서 생산된 면역항체 강화란을 식용으로 사용하거나 이러한 난황에서 IgY를 분리 정제하여 다른 용도로 사용한다. 국내에서 성공적으로 상품화된 것으로는 충치예방, 헬리코박터 파일로리균에 의한 위궤양 예방 및 여드름 치료용 등이 있다.



다. 기능소 강화

생리적 활성물질이 함유된 농업부산물, 카니틴과 타우린 등 유기화합물, 약용식물들을 사료에 첨가하여 산란계에 급여했을 때 이들 가운데 특정성분이 계란 내로 이행한다는 연구결과에 의해서 기능소 강화란을 생산할 수 있다. 현재 상품화된 것으로는 계껍질란, 한방란, 인삼란, 목초란, 해초란 등이 있으나 이에 대한 연구가 미비한 관계로 어떤 물질이 얼마나 이행되고 있는지는 잘 알려져 있지 않다.

라. 성분저하

계란내 성분 가운데 소비자들이 기피하는 성분도 있다. 가장 대표적인 것이 계란 한 개당 230 mg 가량 들어있는 콜레스테롤이다. 따라서 계란내 콜레스테롤 함량을 낮추기 위해서 많은 연구와 노력이 경주되어 왔고 상당히 성공적인 콜레스테롤 함량저하가 이루어지기도 하였으나 다량의 상품란을 생산하기는 쉽지 않다. 그래도 비교적 경제성 있는 생산방법으로 생균제를 산란계에 상당량(1 % 이상) 급여하여 난황내 콜레스테롤 함량을 25 -40 % 감소시키는 것이 가능하다.

Table 1. The development of value-enhanced egg production

연도	내 용	연구개발자
1930	산란사료에 요오드 첨가로 계란내 요오드 수준 증가 (일본)	Sosaki 등
1951	사료에 의한 계란내 비타민 B <sub>12</sub> 수준 증가 (미국)	Denton 등
1961	사료에 의한 계란내 비타민 A 수준 증가 (미국)	Hill 등
1963	계란내 비타민 B <sub>1</sub> 수준 강화 (미국)	Polin 등
1965	계란내 비타민 E 수준 강화 (미국)	Bortor 등
1968	계란내 비타민 B <sub>2</sub> 수준 강화	Jeroch
1972	계란내 바이오틴 수준 강화 (미국)	Brewer와Edwards
1976	요오드 성분이 강화된 계란 "히까리" 출시 (일본)	일본 농산공업
1980	요오드 강화란 제조방법 특허 출원 (한국)	기따미네 신이찌를
1988	비타민 E 강화란 "콜롬버스란" 출시 (일본)	일본 아나이사
1988	영양소 강화 계란 "PURIEGG"와 "요오드 란"의 상품등록 (한국)	퓨리나코리아
1988	오메가3 지방산 강화 계란제조 특허청구 (미국, 한국)	오석연

연도	내 용	연구개발자
1989	비타민 E, D, B <sub>12</sub> 가 강화된 영양란 출시(전 남광주)	퓨리나코리아
1989	미량광물질 온도가 강화된 "요오드란" 출시(전 남광주)	퓨리나코리아
1990	요오드와 비타민 E가 강화된 혈중 콜레스테롤 저하용 계란 "Heartland's Best" 시판 (미국)	C.R.Eggs
1990	오메가 -3 지방산을 강화한 오메가란 출시 (한국)	만나원
1991	서울에서 개최된 양계박람회에서 기능란을 포함한 해초란, 인삼란, 자연란, 특수란의 소개로 소비자들의 인기를 얻음 (한국)	퓨리나, 두산, 만나원 등
1992	오메가-3 지방산이 강화된 계란 "Designer Egg" 출시 (캐나다, 미국, 한국)	알버타주립대 심정석
1998	살모넬라 엔터티티디스 항원에 대한 난황 항체 생산 (한국)	김정우
1999	CLA 지방산 강화 계란 생산 (미국, 일본)	미국아이오와 주립대 일본 Aii 등
2000	연분홍 계란 생산 (일본)	일본 아이치현 농업종합시 험장
2002	생균제를 이용한 저콜레스테롤 계란 (한국)	지니스생명 공학
2002	아라키돈산 강화 계란 생산 (한국)	두산 Biotech
2003	철분 강화 계란 생산 (한국)	이노바이오

Table 2. The classification of value-enhanced eggs

	재료 및 생산방법
영양소 강화란	비타민 : A, D, E, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>12</sub> , 베타카로틴
	광물질 : I, Se, Fe, Mn, Zn
	지방산 : LNA, EPA, DHA, CIA, ARA
면역항체 강화란	IgY : 충치, 여드름, 위궤양, 0157항체, 로타바이러스성 설사
기능소 강화란	유기물 : 타우린, L-카니틴
	부산물 : 인삼, 해초, 목초 한방약제
성분저하란	콜레스테롤

### 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

#### 제 1 절 저 콜레스테롤 계란 생산을 위한 사료·영양 연구 (제 1 세부과제)

##### 1. 미생물제 및 천연물질의 단독급여가 계란 콜레스테롤 함량에 미치는 영향 (실험 1)

###### 가. 재료 및 방법

###### 1) 실험 시료

시료로서 사용한 마늘 분말은 (주)진바이오텍에서 공급받았으며, 마늘은 9.92%의 수분, 16.66%의 조단백질, 0.49%의 조지방, 8.04%의 조섬유 및 14.36%의 조회분 등과 같은 일반성분을 함유하고 있다. Probiotics는 (주)엠에스토피아에서 공급받았으며 고초균, 곰팡이류, 유산균, 광합성세균, 효모균, 방선균 등이 혼합된 복합생균제이다.

###### 2) 실험 사료

옥수수·대두박을 기초로 하여 대사에너지 2800kcal/kg와 16.1%의 조단백질 그리고 기타 영양소의 수준은 NRC 요구량(1994)에 맞도록 기초사료를 배합하여 대조구 사료로 사용하였다. 처리구 사료는 마늘분말을 소맥피 동량 대체하여 1% 및 3% 첨가한 처리구로 실험을 실시하였다. (Table 1-1과 1-2)

Table 1-1. Experimental design

	Garlic powder	Probiotics
	----- % -----	
Control	-	-
T1	1.0	-
T2	3.0	-
T3	-	0.3
T4	-	0.5

Table 1-2. Formula and chemical composition of the experimental diets<sup>1)</sup>

Ingredients (%)	Control	T1	T2	T3	T4
Corn	62.52	62.52	62.52	62.22	62.02
Wheat	3.00	2.00	-	3.00	3.00
Lupin seed	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Soybean meal	13.96	13.96	13.96	13.96	13.96
Rapeseed meal	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Meat meal	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Limestone	9.51	9.51	9.51	9.51	9.51
Dicalcium phosphate	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Tallow	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Choline-chloride (50%)	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
DL-Methionine	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
Mineral mix <sup>2)</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin mix <sup>3)</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Phytase	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
Garlic powder	-	1.00	3.00	-	-
Probiotics	-	-	-	0.30	0.50
Total	100.00	100.00	100.00	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 <sub>n</sub> , kcal/kg			2,800		

<sup>1)</sup> Control, garlic powder and probiotics free; T1, 1% garlic powder; T2, 3% garlic powder; T3, 0.3% probiotics; T4, 0.5% probiotics.

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

<sup>3)</sup> 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, 2.4mg; vitamin B1, 1.2mg; vitamin B2, 4.8mg; vitamin B6, 2.4mg; vitamin B12, 0.02mg; niacin, 15mg; pantothenic acid, 10mg; folic acid, 0.3mg.

### 3) 실험 동물

50주령의 Lohmann Brown 산란계 암컷을 이용하여 동일한 면적의 산란계 2수용 케이지에 모두 5개 처리구 5반복으로, 총 250수를 선발하여 2주간 일반 시판 사료로 예비사육 하였으며, 처리당 산란율이 유사하도록 재배치 한 후 실험에 이용하였으며, 8주간 실험을 실시하였다.

#### 4) 사양 관리

본 실험은 온도와 점등을 조절할 수 있는 산란계 시험용 유창 계사에서 실시하였으며, 물과 사료는 자유 채식시켰다. 기타 일반적인 사양관리는 관행적인 방법에 준하여 실시하였다. 수당 급이 면적과 pen당 급수기 숫자는 동일하도록 하였고, 시험 전 기간 동안 점등은 16L:8D로 일정하게 유지하였다.

#### 5) 조사 항목

##### 가) 사료섭취량, 난 생산성과 간 중량

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

##### 나) 난질 및 난각질

실험 사료 급여 후 매주 생산된 계란 중 평균치에 해당하는 계란을 수집하여 난각 강도, 난각두께 및 Haugh unit 등 계란의 내부 난질 및 난각질 관련 항목을 측정하였다.

난각 강도는 난각 강도계(FHK 卵殼強度計, 富士乎工業株式會社)를 이용하여 계란의 둔단부를 위로하고 수직으로 고정한 후 압력을 가하여 파각되는 순간의 압력을 측정하였다. 난각 강도 측정 후 난백의 높이를 조사하여 난중을 대비한 Haugh unit 수치를 구하였다(FHK 卵白測定台, 富士乎工業株式會社). 난각 두께는 계란의 중앙부 난각 파편을 채취하여 난각 후도계(FHK Peacock, 富士乎工業株式會社)를 통해 측정된 두께의 평균치로 하였다.

##### 다) 혈액 콜레스테롤 농도와 간 기능 관련 효소의 활성

8주간의 실험 종료 후, 처리구 별로 8수씩 선발한 공시계의 익하정맥에서 1회용 주사기로 혈액을 채취한 후 원심분리(1500rpm × 15min)하여 혈청을 분리하였으며, 진단용 콜레스테롤 kit (콜레스테롤 E kit, HDL-콜레스테롤 kit, 영동제약)를 사용하여 비색방법으로 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 농도를 측정하였다.

혈청 내의 glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) 및 glutamic-pyruvic transaminase (GPT) 함량은 GOT-GPT kit (GOT-GPT kit, 영동제약)를 사용하여 비색방법으로 측정하였다.

라) 계란과 간 내 콜레스테롤 함량

실험 3주와 8주째 얻은 계란을 할란하여 난황만 취한 후 homogenizer로 난황을 균질하게 갈아 시료로 이용하였으며, AOAC를 변형시킨 방법(Thomson과 Merloa, 1993; Mark 등, 1996) 및 Folch 법(Folch 등, 1957)을 도입하였으며, gas chromatography (GC, Hewlett Packard packard 5890)를 사용하여 난황 내 콜레스테롤 함량을 분석하였다.

#### (1) Extraction

균질된 난황 2g을 취하여 시료의 20배에 해당하는 Folch용액(chloroform : methanol = 2 : 1, v/v; Folch 등, 1957)을 첨가하였다. Homogenizer (AM 77 model, Nissei)를 이용하여 5,000rpm으로 실온에서 5분간 균질화 하였으며, 여과지(No. 541)와 깔대기를 이용하여 고형물과 추출액을 분리한 후 추출액 2ml을 취했으며 용기 무게를 잰 Centrifuge tube (Pyrex No. 13, 15ml)에 옮겨 질소 충전으로 유기용매를 휘발시킨 후 무게를 재서 지질 비율을 측정하였다.

#### (2) Saponification

질소 충전에 의해 유기 용매를 휘발시킨 총지질을 absolute alcohol에 재용해 하였으며 여기에 5% NaOH을 1ml을 첨가하여 water bath(WB-1, 國際 싸이엔)에서 70°C에서 1시간 동안 가온한 후 실온에서 방냉을 시켰으며 hexane 5ml을 첨가, 혼합한 후 원심분리기(HA-1000-3, 韓一産業)에서 3,000rpm으로 15분간 원심분리 하였으며 2ml의 상층액을 취하여 Silanized되어진 centrifuge tube (Pyrex No, 13)에 옮기고, 질소 충전으로 유기용매를 휘발시켰다.

#### (3) Derivatization

1ml의 dimethylformamide를 centrifuge tube에 넣어 재용해 시키고, hexamethyl-disilane 0.2ml와 trimethylchlorosilane 0.1ml을 첨가한 후, 혼합하여 실온에서 15분간 방치하였으며, internal standard(0.1%, 5 $\alpha$ -cholestane/heptane)와 물 10ml을 첨가, 혼합하였다. 원심분리기에서 2분간, 3,000rpm으로 원심분리를 한 후 상층액을 채취하여 microvial에 옮겼다.

#### (4) GC를 이용한 콜레스테롤 분석

30m×0.25mm id×0.25um film thickness(SACTM-5, Supelco) fused silica capillary column과 detector FID를 장착한 GC(Hewlett packard 5890 series II; Hewlett packard 6890 series injector)를 이용하여 분석하였다. Carrier로는 helium gas를 이용하였고, 초기 온도와 최종 온도는 280°C, detector 온도는 300°C로 설정하였다.

마) HMG-CoA reductase 및 VLDL receptor의 mRNA 발현 수준 정량

(1) 시료준비

실험 8주 종료시에 도살한 개체에서 간의 일부를 채취하여 diethyl pyrocarbonate (DEPC, SIGMA Aldrich, USA) 처리한 생리식염수로 세척하고 액체질소로 급속 냉동시킨 후에 deep freezer (-72 °C)에서 보관하였다.

(2) Total RNA 추출

RNA의 추출은 Chomczynski와 Sacchi (1987)의 acid/guanidinium/phenol/chloroform법(TRIZOL<sup>®</sup> reagent, Invitrogen<sup>™</sup>, USA)을 응용하여 간 조직으로부터 total RNA를 추출하였다. Total RNA 추출의 전 과정은 RNase free condition에서 진행되었다.

(3) RT-PCR

추출한 total RNA는 DNA contamination을 방지하기 위하여 8  $\mu$ l의 total RNA에 1  $\mu$ l DNase(RQ1 RNase-free DNase, Promega, MADISON, USA)와 10 $\times$  reaction buffer(RQ1 10 $\times$  Reaction Buffer, Promega, MADISON, USA)를 넣은 후 37 °C에서 1시간 동안 incubation 하여 total RNA 내 DNA를 제거한 후 1  $\mu$ l의 stop solution(RQ1 DNase Stop Solution, Promega, MADISON, USA)과 3분간 반응하여 DNase를 불활성화하였다. Accupower<sup>®</sup> RT-PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 complementary DNA (cDNA)를 합성하였다. Reverse transcription은 2.0  $\mu$ g의 RNA template와 2.0  $\mu$ g의 oligo(dT)<sub>18</sub> primer (Bioneer, Daejeon, Korea)를 총 부피 50  $\mu$ l로, cDNA 합성과정 (42 °C, 60분)과 reverse transcriptase 불활성과정 (94 °C, 5분)으로 수행되었다.

Housekeeping gene인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)와 HMG-CoA reductase의 primer의 sequence는 Table 1-3에 나타내었다.

얻어진 cDNA를 template로 하여 PCR을 수행하였다. 0.5  $\mu$ l의 Taq polymerase (5unit/ $\mu$ l, Takara EX Taq<sup>™</sup>, Takara EX Taq<sup>™</sup> polymerase, Takara, Japan), 2  $\mu$ l의 10 $\times$  buffer (10 $\times$  EX Taq<sup>™</sup> buffer, Takara, Japan), 2  $\mu$ l의 dNTP mixture (각 2.5 mM, Takara, Japan), 1  $\mu$ g의 template, 각각의 primer 1  $\mu$ g (25 pmole) 및 13.5  $\mu$ l의 3차 증류수를 충분히 혼합하여 총 20  $\mu$ l의 반응 부피로 PCR을 실시하였다.

HMG-CoA reductase mRNA에 대한 primer와 GAPDH mRNA에 대한 primer를 사용한 정량적 PCR을 통해 DNA를 증폭하고 1.7% agarose gel (Takara, Tokyo, Japan)에서 전기영동을 수행하였다. DNA marker와 전기영동 후 DNA band를 비교하여 target gene임을 확인한 후, image analyzer (Bio-capt ver. 99.4, Vilber

Loumat, France)를 사용하여 GAPDH의 DNA band의 optical density (OD)값과 HMG-CoA reductase OD값을 측정하였으며, GAPDH의 DNA band의 OD값에 대한 HMG-CoA reductase OD값의 절대값으로 비교, 조사하였다.

Table 1-3. Primer sequence of GAPDH and HMG-CoA reductase

Gene	Primer sequence	Product size (bp)	Anneal (°C)	Cycle
GAPDH	Sense AAGCTTGTTTCCTGGTATG	264	55	25
	Anti-sense AGTTTCTATCAGCCTCTCC			
HMG-CoA reductase	Sense ACACGCTGTATAGCAATCC	157	63	40
	Anti-sense CCGTCAGTTCTTTATCCAA			
VLDL receptor	Sense ACCTCACAATTGATATTGG	161	55	40
	Anti-sense ACAAGCATGTTTATCATCC			

바) 계란 보존성

실험 종료 5일전부터 생산된 계란을 전량 수집하여 종란 저장고에서 보존하였다. 7일째 및 15일째 보존 중인 계란의 Haugh unit를 조사하여 시간 경과에 따른 변화를 조사하였다.

6) 통계 분석

모든 얻어진 결과에 대한 통계분석은 Statistical Analysis System (SAS, 2002)의 General Linear Model (GLM) Program을 이용하여 실시하였고 분산분석상의 통계적인 유의차가 인정될 때 Duncan의 multiple range test를 이용하여 처리간의 유의성을 검정하였다(Duncan, 1955).



나. 결과 및 고찰

1) 사료섭취량 및 난 생산성에 미치는 영향

산란계 사료 내 생균제 및 마늘분말의 첨가가 사료섭취량과 난 생산성에 미치는 영향에 대해 Table 1-4에 명시하였다.

산란율은 대조구에 비해 모든 처리구에서 다소 낮아지는 경향을 나타내었으나, 처리간에 유의한 차이는 아니었다. 난중 및 일산란량에서도 처리간에 큰 차이는 없는 것으로 나타났다. 전 실험기간 중의 1일 평균 사료섭취량과 간의 상대적 중량에서도 처리간에 유의한 차이는 인정되지 않았다.

Table 1-4. Effects of dietary probiotics and garlic powder on the feed intake, egg performances and liver weights of laying hens<sup>1),2)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4
Feed intake, g/hen/day	138.2	136.9	138.5	137.4	137.6
Egg production, %	81.2	74.1	78.9	75.1	76.0
Egg weight, g/egg	66.0	66.2	65.1	67.1	65.2
Egg mass	53.6	49.1	51.4	50.4	49.6
Liver, g/100g BW	1.97	2.19	2.23	1.94	2.13

<sup>1)</sup> Control, garlic powder and probiotics free; T1, 1% garlic powder; T2, 3% garlic powder; T3, 0.3% probiotics; T4, 0.5% probiotics.

<sup>2)</sup> Mean (n=20).

2) 난질 및 난각질에 미치는 영향

산란계 사료 내 생균제 및 마늘분말의 첨가가 난질 및 난각질에 미치는 영향에 대해 Table 1-5에 명시하였다.

난각강도, 난각두께 및 난황색에서는 처리간에 큰 차이가 없는 것으로 나타났으나, 생균제와 마늘분말을 급여함에 따라 Haugh unit가 유의하게 증가하거나 증가하는 경향을 나타내었다( $P < 0.05$ ). 마늘분말을 3% 수준으로 급여했던 T2 처리구에서는 대조구 및 T1 처리구에 비해 유의한 차이 없이 증가하는 경향을 보인 반면, 생균제 급여구(T3 및 T4)에서는 일관되게 대조구에 비해 Haugh unit 수치가 유의하게 증가하는 결과가 관찰되었다.

Table 1-5. Effects of dietary probiotics and garlic powder on the egg and eggshell qualities in laying hens<sup>1)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4
Eggshell strength, kg/cm <sup>2</sup>	3.27	3.18	3.07	3.23	3.13
Eggshell thickness, 0.01mm	36.71	36.76	37.78	36.25	37.20
Yolk color, R.C.F	8.26	8.22	8.18	8.22	8.27
Haugh unit	71.38 <sup>b</sup>	71.80 <sup>b</sup>	72.55 <sup>ab</sup>	74.41 <sup>a</sup>	74.18 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Control, garlic powder and probiotics free; T1, 1% garlic powder; T2, 3% garlic powder; T3, 0.3% probiotics; T4, 0.5% probiotics.

<sup>a-b</sup> Means within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

### 3) 혈액 성분 에 미치는 영향

산란계 사료 내 생균제 및 마늘분말의 첨가가 혈액 내 총콜레스테롤 농도, GOT 및 GPT 활성에 미치는 영향에 대해 Table 1-6에 명시하였다.

대조구에 비하여 생균제와 마늘분말을 급여한 모든 처리구에서 혈중 총 콜레스테롤 농도가 약간 감소하는 경향을 나타내었으나, 유의한 차이까지는 도달하지 못하였다. 혈중 GOT 수치에서는 처리구간에 큰 차이가 없었으며, GPT 수치에서도 다소 감소하는 경향은 있었으나 처리간에 유의한 차이는 인정되지 않았다. 산란계에서도 혈중 GOT 및 GPT 수치는 간 기능의 이상 여부와 조직 손상 정도를 판단하는 지표로 이용되는데(Lumeiji, 1997), 이들 효소 활성과 섭취량 및 난 생산성의 결과로부터 유추한다면 생균제와 마늘분말의 급여가 생리적으로 부정적인 영향을 나타내지는 않을 것으로 생각된다.

마늘분말 및 마늘 추출물을 급여한 여러 연구에서 혈중 콜레스테롤의 변화에 대해서는 상반된 결과들이 보고되었다. Reddy 등(1991)은 마늘유의 급여 후에 혈장 콜레스테롤 수준이 변화하지 않았다고 하였으나, Qureshi 등(1983)은 마늘 추출물을 급여한 개체에서 혈청 콜레스테롤이 30% 이상 감소하였다고 보고하였다. 마늘분말을 급여한 유사 연구에서도 마늘분말 첨가 수준에 따라 비례하여 혈중 콜레스테롤이 감소하였다(Chowdhury 등, 2002). 이러한 결과의 차이는 마늘의 처리 과정 중에 생리 활성을 발휘하는 allicin 등의 함유 정도에 좌우되는 듯하다.

Table 1-6. Effects of dietary probiotics and garlic powder on various blood profiles in laying hens<sup>1),2)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4
TOTAL-C, mg/dl	125.88	115.29	113.24	114.61	107.53
GOT, U/dl	146.76	168.50	147.30	139.97	155.58
GPT, U/dl	11.94	7.58	8.88	9.37	9.20

<sup>1)</sup> Control, garlic powder and probiotics free; T1, 1% garlic powder; T2, 3% garlic powder; T3, 0.3% probiotics; T4, 0.5% probiotics.

<sup>2)</sup> Means

#### 4) 계란 및 간 내 콜레스테롤 함량에 미치는 영향

산란계 사료 내 생균제 및 마늘분말의 첨가가 계란 및 간 내 콜레스테롤 함량에 미치는 영향에 대해 Table 1-7에 명시하였다.

마늘분말을 급여한 처리구(T1, T2)에서는 대조구에 비해 난황 콜레스테롤 함량이 감소하는 경향이 명확히 나타났으나, 개체간의 변이가 커서 통계적으로 유의한 차이에는 도달하지 못하였다. T1 및 T2 처리구에서 실험기간 중의 평균 난황 내 콜레스테롤 함량은 평균적으로 13.5-20% 정도 감소한 것으로 나타났다. 실험 3주차에서는 대조구와 거의 차이가 없었으나 생균제 급여구(T3 및 T4)에서는 8주차의 난황 콜레스테롤 함량이 대조구에 비해 다소 감소하는 결과가 관찰되었다. 간 내 콜레스테롤 함량은 처리에 따른 영향이 없는 것으로 나타났다.

마늘분말을 급여했던 선행연구들 중 일부에서 난황 콜레스테롤의 유의한 감소가 인정되었다. Chowdhury 등(2002)은 마늘분말을 여러 수준으로 첨가 급여했을 때 난황 콜레스테롤 수준이 첨가 수준에 따라 반비례하여 감소하는 결과를 관찰하였다. 국내의 유사연구에서도 생마늘을 0.5% 또는 1.0% 수준으로 급여한 실험에서 난황 내 콜레스테롤이 유의하게 감소하였다(윤 등, 1998). 반면 Reddy 등(1991)은 마늘유의 급여가 난황 콜레스테롤 수준으로 감소시키지 못했다고 하였다. 본 실험에서는 마늘분말 급여 후에 난황 콜레스테롤 수준이 대조구에 비해 최대 20%까지 감소하는 결과가 시사되었으며 이는 국내에서 시판되는 저 콜레스테롤 계란의 감소폭과 유사한 정도라 판단된다.

Table 1-7. Effects of dietary probiotics and garlic powder on contents of egg cholesterol in egg yolk of laying hens<sup>1,2)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4
3wk cholesterol, mg/g	14.72	12.74	12.23	14.01	14.68
8wk cholesterol, mg/g	14.41	11.34	11.56	13.70	11.49
liver cholesterol, mg/g	2.04	2.22	2.23	2.06	2.22

<sup>1)</sup> Control, garlic powder and probiotics free; T1, 1% garlic powder; T2, 3% garlic powder; T3, 0.3% probiotics; T4, 0.5% probiotics.

<sup>2)</sup> Means

5) HMG-CoA reductase 및 VLDL receptor의 mRNA 발현 수준에 미치는 영향  
 산란계 사료 내 생균제 및 마늘분말의 첨가가 HMG-CoA reductase 및 VLDL receptor의 mRNA 발현 수준 함량에 미치는 영향에 대해 Figure 1-1에 명시하였다. 생균제 및 마늘분말의 첨가 급여에 따른 HMG-CoA reductase는 대조구에 비하여 T2 처리구에서 다소 감소하는 것으로 나타났으며 T3 첨가구에서 증가하는 것으로 관찰되었다. 그러나 VLDL receptor에 대한 생균제 및 마늘분말의 영향은 없는 것으로 관찰되었다. 이에 대한 보다 자세한 기전을 알기위해서는 배설 경로에 관여되는 효소의 mRNA의 발현을 조사해야 할 것으로 사료된다.

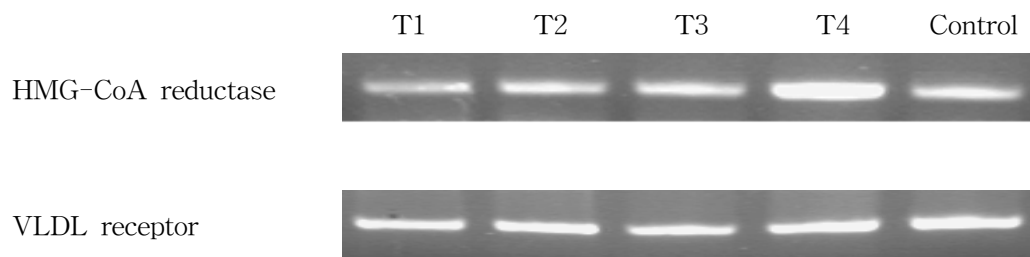


Figure 1-1. Expressions of HMG-CoA reductase and VLDL receptor mRNA

6) 계란의 보존성에 미치는 영향

Table 1-8에는 생균제 및 마늘분말의 첨가가 계란의 보존성에 미치는 영향에 대해 나타내었다.

마늘분말 3% 급여구의 보존 7일째 및 14일째의 Haugh unit는 대조구에 비해 유의하게 높았으며( $P < 0.05$ ), 생균제 급여구(T3 및 T4)에서도 Haugh unit가 대조구에 비해 증가하는 경향을 나타내었다. 계란의 Haugh unit은 보존 기간이 경과할수록 저하하며 따라서 계란의 신선도를 판단하는 지표가 될 수 있다(Williams, 1992). Haugh unit에 영향을 미치는 영양적 인자는 그리 많지 않지만(Naber, 1979), 비타민 C, E 및 셀레늄과 같은 천연 항산화물질이 난백 품질의 개선에 도움이 된다는 연구 결과가 보고되었다(Keshavarz, 1996; Sahin 등, 2003). 본 연구실에서 발표한 선행연구에서 항산화 성분을 함유하는 마늘분말을 산란계 사료에 첨가 급여했을 때 계란의 신선도가 더 잘 유지될 수 있음이 밝혀진 바 있다(Lim 등, 2006). 마늘 내의 항산화 성분에 의해 계란의 보존성이 증가한 것으로 생각되며, 계란의 외관적 부가가치를 향상시키는 효과가 있는 것으로 판단되었다.

Table 1-8. Effects of dietary probiotics and garlic powder on the change of Haugh unit during storage at room temperature<sup>1)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4
7 day	65.45	65.53	70.43	70.42	70.64
14 day	60.01 <sup>b</sup>	61.81 <sup>b</sup>	69.14 <sup>a</sup>	62.85 <sup>b</sup>	62.37 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> Control, garlic powder and probiotics free; T1, 1% garlic powder; T2, 3% garlic powder; T3, 0.3% probiotics; T4, 0.5% probiotics.

<sup>a-b</sup> Means within the same row with no common superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

2. 미생물제 및 유효광물질의 혼합급여가 계란 콜레스테롤 함량에 미치는 영향(실험 2)

가. 재료 및 방법

1) 실험 시료

시료로서 사용한 올리고당은 (주)삼양제넥스에서 공급받았다. Probiotics는 (주)엠에스토피아에서 공급받았다. probiotics는 고초균, 곰팡이류, 유산균, 광합성세균, 효모균, 방선균 등이 혼합된 복합생균제이다. 구리는 덕산약품공업주식회사에서 구입한 정제 황산구리( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )를 미세 분쇄하여 첨가하였으며, 사용한 시료에는 황산구리 이외에 30ppm의 염소, 70 ppm의 철, 40 ppm의 총 질소 및 0.3%의 황산염을 함유하고 있다. 셀레니움은 (주)이지바이오에서 공급받아 사용하였다.

2) 실험 사료

옥수수·대두박을 기초로 하여 대사에너지 2800kcal/kg와 16.1%의 조단백질 그리고 기타 영양소의 수준은 NRC 요구량(1994)에 맞도록 기초사료를 배합하여 대조구 사료로 사용하였다. 처리구 사료에는 올리고당을 0.1%씩 모두 첨가한 후, probiotics 0.3%, 구리 100ppm, 셀레니움 0.3ppm을 첨가한 T1처리구, probiotics 0.5%, 구리 100ppm, 셀레니움 0.3ppm을 첨가한 T2처리구, probiotics 0.3%, 구리 200ppm, 셀레니움 0.3ppm을 첨가한 T3처리구, probiotics 0.3%, 구리 100ppm, 셀레니움 1.0ppm을 첨가한 T4처리구, probiotics 0.5%, 구리 200ppm, 셀레니움 1.0ppm을 첨가한 T5처리구 및 probiotics 0.7%, 구리 250ppm, 셀레니움 1.5ppm을 첨가한 T6처리구를 두어 실험을 실시하였다. (Table 2-1과 2-2)

Table 2-1. Experimental design

	Oligosaccharide, %	Probiotics, %	Copper, ppm	Selenium, ppm
Control	-	-	-	-
T1	0.1	0.3	100	0.3
T2	0.1	0.5	100	0.3
T3	0.1	0.3	200	1.0
T4	0.1	0.3	100	0.3
T5	0.1	0.5	200	0.3
T6	0.1	0.7	250	1.5

Table 2-2. Formula and chemical composition of the experimental diets<sup>1)</sup>

Ingredients (%)	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Corn	65.52	65.12	64.92	65.12	65.12	64.92	64.72
Lupin seed	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Soybean meal	13.96	13.96	13.96	13.96	13.96	13.96	13.96
Rapeseed meal	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Meat meal	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Limestone	9.51	9.51	9.51	9.51	9.51	9.51	9.51
Dicalcium phosphate	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Tallow	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Choline-chloride (50%)	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
DL-Methionine	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
Mineral mix <sup>2)</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin mix <sup>3)</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Phytase	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
Oligosaccharide	-	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Probiotics	-	0.30	0.50	0.30	0.30	0.50	0.70
Copper	-	100ppm	100ppm	200ppm	100ppm	200ppm	250ppm
Selenium	-	0.3ppm	0.3ppm	1.0ppm	0.3ppm	0.3ppm	1.5ppm
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	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 <sub>n</sub> , kcal/kg				2,800			

<sup>1)</sup> T1, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 100ppm Cu + 0.3ppm Se; T2, 0.1% oligosaccharide + 0.5% probiotics + 100ppm Cu + 0.3ppm Se; T3, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 200ppm Cu + 0.3ppm Se; T4, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 100ppm Cu + 1ppm Se; T5, 0.1% oligosaccharide + 0.5% probiotics + 200ppm Cu + 1ppm Se; T6, 0.1% oligosaccharide + 0.7% probiotics + 250ppm Cu + 1.5ppm Se.

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

<sup>3)</sup> 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, 2.4mg; vitamin B1, 1.2mg; vitamin B2, 4.8mg; vitamin B6, 2.4mg; vitamin B12, 0.02mg; niacin, 15mg; pantothenic acid, 10mg; folic acid, 0.3mg.

### 3) 실험 동물

53주령의 Hy-Line Variety Brown 산란계 암컷을 이용하여 동일한 면적의 산란계 2수용 케이지에 모두 7개 처리구 3반복으로, 총 210수를 선발하여 2주간 일반 시판 사료로 예비사육 하였으며, pen당 산란율이 유사하도록 재배치 한 후 실험에 이용하였으며, 6주간 실험을 실시하였다.

### 4) 사양 관리

실험 1과 동일하게 시행하였다.

### 5) 조사 항목

가) 사료섭취량, 난 생산성과 간중량  
실험 1과 동일하게 시행하였다.

나) 난질 및 난각질  
실험 1과 동일하게 시행하였다.

다) 혈액 콜레스테롤 농도와 간 기능 관련 효소의 활성  
실험 1과 동일하게 시행하였다.

라) 계란 내 콜레스테롤 함량

실험 2, 4 및 6주차 종료 시에 각 처리구에서 유사한 체중을 가진 개체에서 간과 혈액을 채취하여, 간 내 TOTAL-C, 중성지방, 인지질(phospholipid)을 측정하였으며, 혈청 내 cholesterol ester, 중성지방, 유리 콜레스테롤(free cholesterol), 인지질 농도를 측정하였다. 이때 간은 생리 식염수로 평균 다음 표면의 습기를 제거하였으며, 혈액은 채취한 후 원심분리(1,500rpm × 15min)하여 혈청을 얻었다. 이렇게 얻어진 간과 혈청은 분석 전까지 냉동(-20℃) 보관하였다. Folch 등(1957)의 방법을 응용하여 총지질을 추출하였으며, An 등(1997)의 방법을 응용하여 IATRO SCAN(MK-6 TLC/FID analyzer, Iatron Laboratories, Inc., Tokyo, Japan)으로 간 및 혈청 내 각 지질분획의 함량을 분석하였다.

#### (1) 총지질의 추출

간 및 혈청 내 지질의 추출은 Folch 등(1957)의 방법에 기초하여 수행하였다. Folch 용액(chloroform : methanol = 2:1, v/v) 10ml에 혈청 및 간(간 1g을 취하여 탈이온수로 10배 희석) 0.5ml과 내부표준물질(0.1% cholesterol acetate in Folch



solution) 1ml을 첨가하였다. 실온에서 5분간 균질화한 후 여과지(Whatman No.541)를 이용해 여과하였다. 단백질을 제거를 위해 탈이온수 1ml을 첨가하여 혼합한 후 원심분리기(HA-1000-3, Hanil industry, Korea)에서 원심분리(2,500rpm×10min)한 후 aspirator를 이용하여 상층부를 흡입제거하고, 하층 기저부를 감압건조기를 이용하여 완전 건조시켰다. 방냉 후 Folch solution 1ml을 첨가하여 재용해한 후 이를 추출액으로 사용하였다.

#### (2) 지질분획의 분리

추출액을 microdispenser를 이용하여 silica gel chromarod(CHROMAROD-SIII, Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc., Japan)에 1 $\mu$ l을 spot 하고 제 1 전개용액(hexane : diethylether : formic acid = 60ml : 10ml : 0.1ml)이 들어있는 전개조 내에서 9cm의 높이까지 1차 전개시켰고, 60 $^{\circ}$ C 드라이 오븐에서 2분간 건조시켰다. 건조 후 제 2 전개용액(benzene : hexane = 40ml : 40ml)이 들어있는 전개조 내에서 10cm 높이까지 2차 전개시킨 후 60 $^{\circ}$ C 건조기에서 다시 2분간 건조시켰다.

#### (3) IATRO SCAN을 이용한 지질분획의 분석

1, 2차 전개를 통해 분리된 각 지질분획은 IATRO SCAN을 이용하여 분석하였다. IATRO SCAN의 분석 조건은 Table 2-3에 나타낸 바와 같다.

#### (4) 각 지질분획의 정량

IATRO SCAN의 FID는 검출하는 물질에 따라 감도차가 발생하기 때문에 정량분석을 실행하기 위해 측정된 면적비 대 성분량의 상대적 검량선을 작성하였다. 각 실험 성분의 무게를 정확히 측정한 후 혼합하고 이를 Folch 용액(chloroform : methanol = 2:1, v/v) 1ml로 용해시켰다. 사용된 표준혼합시료용액의 성분 농도는 Table 2-4에 나타내었다. 표준혼합시료용액을 위의 방법과 동일하게 수행하여 chromatogram을 얻었다. 실험성분과 내부표준물질의 peak 면적비( $A_x/A_s$ )를 통해 실험성분과 내부표준물질의 중량비( $W_x/W_s$ )를 구하였으며 아래의 방정식에 따라 간 및 혈청의 각 지질분획의 함량을 계산하였다.

$$\text{간 내 함량(mg/g)} = (W_x/W_s) \times \text{내부표준물질(mg)} / \text{시료(mg)} \times 10$$

$$\text{혈청 내 함량(mg/dl)} = (W_x/W_s) \times \text{내부표준물질(mg)} / \text{시료(mg)} \times 100$$

Table 2-3. Analytical conditions of IATRO SCAN

Operation condition	
Stationary phase	CHROMAROD-SIII
Mobile phase	10ml
1st. hexane : diethylether : formic acid	60ml : 10ml: 0.1ml
2nd. benzene : hexane	40ml : 40ml
Hydrogen flow	160ml/min
Air flow	2000ml/min
Scanning speed	30sec/scan

Table 2-4. The contents of each component in standard solution<sup>1)</sup>

	Cho.E	Cho.A	TP	Cho	PCD
	mg/ml				
No. 1	12.00	1.0	7.50	2.00	12.50
No. 2	6.00	1.0	3.75	1.00	6.25
No. 3	3.00	1.0	1.88	0.50	3.13
No. 4	1.50	1.0	0.94	0.25	1.57
No. 5	0.75	1.0	0.47	0.13	0.79

<sup>1)</sup> Cho.E: cholesterol palmitate; Cho.A: cholesterol acetate; TP: tripalmitin; Cho: cholesterol; PCD: L-3-phosphatidylcholine dipalmitate.

마) HMG-CoA reductase와 VLDL receptor의 mRNA 발현 수준 정량

실험 1과 동일한 방법으로 RT를 시행하였으며, 얻어진 cDNA를 template로 하여 real-time PCR기기(Rotor-Gene RG-3000, Corbett Research, Australia)를 사용하여 real-time quantitative PCR을 수행하였다. Real-time PCR은 SYBR Green이 포함된 mastermix (QuantiTect SYBR Green PCR kit, Qiagen)를 사용하여 reaction volume 20 $\mu$ l로 맞추어 실시하였으며, PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 15분, 94 $^{\circ}$ C에서 15-30초, 60 $^{\circ}$ C에서 20-30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초씩 총 40회 반복하여 SYBR Green의 형광량을 측정하였으며, melting curve 단계는 65 $^{\circ}$ C에서 95 $^{\circ}$ C까지 0.2 $^{\circ}$ C씩 온도를 높이면서 형광량을 측정하여 GAPDH와 HMG-CoA reductase 및 VLDL receptor의 발현정도를 확인하였다. Control로 house keeping gene인 GAPDH를 사용하여 normalize를 한 후, 이 값을 통계 처리하여 그래프로 도식화하였다. (Table 2-5 과 2-6)

Table 2-5. Primer sequence of GAPDH, HMG-CoA reductase, VLDL receptor for real-time PCR

Gene	Primer sequence		Product size(bp)	Anneal (°C)	Cycle
GAPDH	Sense	AAGCTTGTTTCCTGGTATG	264	60	40
	Anti-sense	AGTTTCTATCAGCCTCTCC			
HMG-CoA reductase	Sense	TCCCTGAACCCTCATCTTTG	250	58	40
	Anti-sense	TCTGCAAGAATACGGCTCCT			
VLDL receptor	Sense	ACCTCACAATTGATATTGG	161	58	40
	Anti-sense	ACAAGCATGTTTATCATCC			

Table 2-6. Real-time cycler conditions for the lightcycler system

Cycle	Cycle Point
Hold @ 95°C, 15 min 0 secs	
Cycling (40 repeats)	Step 1 @ 94°C, hold 15-30 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 20-30 secs
	Step 3 @ 72°C, hold 30 secs, acquiring to Cycling
Melt (65-95°C), hold 45 secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt	
Hold2 @ 25°C, 1 min 0 secs	

6) 통계 분석

실험 1과 동일하게 결과를 통계처리 하였다.

## 나. 결과 및 고찰

### 1) 사료섭취량 및 난 생산성에 미치는 영향

산란계 사료 내 올리고당, 생균제, 구리 및 셀레니움의 복합 급여가 사료섭취량과 난 생산성에 미치는 영향에 대해 Table 2-7에 명시하였다.

사료섭취량에서는 처리간에 큰 차이가 없었으나, 산란율, 난중 및 일산란량에서는 처리간에 유의한 차이가 인정되었다. 산란율은 T1 처리구에서 가장 높았고 T3 및 T4 처리구 역시 대조구, T2 및 T6 처리구에 비해 유의하게 높은 결과를 나타내었다. 난중은 T2 처리구에서 가장 낮았으며, 대조구, T4, T5 및 T6 처리구에 비해 유의하게 낮았다. 일산란량은 대조구와 T6 처리구가 다른 처리구에 비해 유의하게 감소한 것으로 나타났다. 간의 상대적 중량에서는 처리간에 큰 차이가 없었다.

산란계 사료 내에 생균제를 급여한 연구에서는 난 생산성이 유의하게 증가한 것으로 나타났다(Panda 등, 2003). 장기간의 사양실험에서도 생균제의 급여는 산란율의 개선에 효과가 있다고 하였다(Kurtoglu 등, 2004). 구리의 급여 시험에서는 사료 내 250 ppm 수준까지는 산란율에 긍정적인 효과를 나타내었지만(Pesti와 Bakalli, 1998), 250 ppm을 초과하면 사료섭취량과 산란율이 감소하였다(Pearce 등, 1983). 대조구 사료에 셀레니움을 0.38ppm (Utteback 등, 2005) 또는 0.51ppm (Jiakui와 Xiaolong, 2004) 수준으로 추가 공급한 연구에서도 사료섭취량과 난 생산성에 크게 영향을 미치지 않았다. Payne 등(2005)은 셀레니움을 3.0 ppm으로 증가시켰을 때 난중이 증가하는 효과가 있었다고 하였는데, 이는 본 실험의 결과와는 대조적인 것으로 생각된다. 본 실험에서는 생균제, 구리 및 셀레니움을 비교적 높은 수준으로 혼합급여 했기 때문에 상기의 결과와 단순히 비교하기 어려우며 난 생산성에 미치는 영향 역시 명확히 도출할 수 없었다.

### 2) 난질 및 난각질에 미치는 영향

산란계 사료 내 올리고당, 생균제, 구리 및 셀레니움의 복합 급여가 난질 및 난각질에 미치는 영향에 대해 Table 2-8에 명시하였다.

난각강도, 난각두께, Haugh unit 및 난황색 모두 처리간에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 2-7. Combination feeding of oligosaccharide, probiotics, copper and selenium on feed intake and laying performances in laying hens<sup>1),2),3)</sup>

Treatments	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Feed intake, g/day/bird	122.59 ±0.66	126.78 ±2.82	125.70 ±4.02	125.78 ±6.64	125.06 ±2.84	127.70 ±4.09	115.70 ±9.13
Egg production rate, %	69.27 ±1.39 <sup>c</sup>	75.62 ±1.17 <sup>a</sup>	69.97 ±0.46 <sup>c</sup>	73.88 ±0.68 <sup>ab</sup>	72.68 ±0.82 <sup>b</sup>	74.20 ±0.47 <sup>ab</sup>	69.30 ±0.85 <sup>c</sup>
Egg weight, g/egg	67.13 ±0.23 <sup>a</sup>	66.18 ±0.25 <sup>ab</sup>	65.65 ±0.57 <sup>b</sup>	66.15 ±0.17 <sup>ab</sup>	66.85 ±0.56 <sup>a</sup>	67.02 ±0.17 <sup>a</sup>	66.08 ±0.17 <sup>a</sup>
Egg mass, g/hen/day	46.55 ±1.08 <sup>b</sup>	50.01 ±0.75 <sup>a</sup>	45.88 ±0.31 <sup>b</sup>	48.88 ±0.51 <sup>a</sup>	48.53 ±0.49 <sup>a</sup>	49.70 ±0.38 <sup>a</sup>	45.78 ±0.59 <sup>b</sup>
Liver weight , g/100g BW <sup>3)</sup>	1.88 ±0.11	1.77 ±0.10	1.87 ±0.03	1.73 ±0.08	1.85 ±0.05	1.76 ±0.05	1.79 ±0.03

<sup>1)</sup> T1, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 100ppm Cu + 0.3ppm Se; T2, 0.1% oligosaccharide +0.5% probiotics + 100ppm Cu + 0.3ppm Se; T3, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 200ppm Cu + 0.3ppm Se; T4, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 100ppm Cu + 1ppm Se; T5, 0.1% oligosaccharide + 0.5% probiotics + 200ppm Cu + 1ppm Se; T6, 0.1% oligosaccharide + 0.7% probiotics + 250ppm Cu + 1.5ppm Se.

<sup>2)</sup> <sup>a-c</sup> Means ± SE within a row with no common letter are significantly different (P<0.05).

<sup>3)</sup> BW=body weight

Table 2-8. Combination feeding of oligosaccharide, probiotics, copper and selenium on egg and eggshell qualities in laying hens.<sup>1),2),3)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Eggshell strength, kg/cm <sup>2</sup>	3.10 ±0.25	3.10 ±0.06	3.23 ±0.17	3.03 ±0.15	3.20 ±0.10	3.23 ±0.23	3.07 ±0.19
Eggshell thickness, 0.01mm	36.77 ±0.61	37.43 ±0.13	36.13 ±0.48	36.37 ±0.38	36.53 ±0.74	37.23 ±0.48	36.67 ±0.54
Haugh unit	84.67 ±2.93	89.03 ±0.25	86.77 ±0.12	87.77 ±0.23	88.27 ±0.34	88.17 ±0.61	85.87 ±0.15
Yolk color, R.C.F. <sup>3)</sup>	7.61 ±0.45	8.30 ±0.25	7.87 ±0.12	8.07 ±0.03	8.17 ±0.03	8.17 ±0.12	7.73 ±0.03

<sup>1)</sup> T1, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 100ppm Cu + 0.3ppm Se; T2, 0.1% oligosaccharide +0.5% probiotics + 100ppm Cu + 0.3ppm Se; T3, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 200ppm Cu + 0.3ppm Se; T4, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 100ppm Cu + 1ppm Se; T5, 0.1% oligosaccharide + 0.5% probiotics + 200ppm Cu + 1ppm Se; T6, 0.1% oligosaccharide + 0.7% probiotics + 250ppm Cu + 1.5ppm Se.

<sup>2)</sup> Means ± SE (n=8)

<sup>3)</sup> Roche color fan.

### 3) 혈액 성분에 미치는 영향

산란계 사료 내 올리고당, 생균제, 구리 및 셀레니움의 혼합 급여가 혈액 콜레스테롤 분획 및 효소 활성에 미치는 영향에 대해 Table 2-9에 명시하였다.

혈중 총 콜레스테롤, HDL-C 및 HDL-C/total-C 비율 모두 처리간에 유의한 차이가 발견되지 않았다. Kurtoglu 등(2004)은 생균제를 급여한 후 공시계의 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 농도가 유의하게 감소하였다고 보고하였고 Panda 등(2003) 역시 백색 산란계를 공시한 연구에서 생균제의 급여에 의해 혈중 콜레스테롤이 감소하는 결과를 관찰하였다. 구리의 첨가는 산란계에서 혈장 내 콜레스테롤 농도를 감소시켰으며(Pesti와 Bakalli, 1998) 이는 우리의 선행 연구에서도 확인된 바 있다(Lim 등, 2006). HDL-C 농도에 대해서는 변화하지 않는다는 결과와 증가한다는 결과가 모두 보고되었으며, 본 실험에서는 HDL-C의 농도가 변화하지 않음으로서 Lim 등(2006)의 연구 결과와 일치하였다. 본 실험에서는 생균제, 구리 및 셀레니움의 혼합 급여가 혈중 콜레스테롤 분획에 큰 영향을 미치지 않음으로서 이들을 단일 급여했던 이전의 연구 결과들과는 잘 일치하지 않았는데, 이는 혼합 급여에 의한 교호작용 때문인지 또는 다른 요인에 의한 것인지는 추후 실험을 통해 규명해야 할 것이다.

GOT 및 GPT 활성에서도 처리간에 큰 차이가 없었으며, 이는 실험 1에서 분석한 결과와 일치하였다. 비교적 높은 수준의 올리고당, 생균제, 구리 및 셀레니움의 혼합 급여가 산란계의 생리적 반응에 영향을 미치지 않은 것으로 생각되었다.

Table 2-9. Combination feeding of oligosaccharide, probiotics, copper and selenium on various blood profiles in laying hens.<sup>1),2),3)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Total-C, mg/dl	128.83 ±3.64	130.98 ±2.76	137.65 ±1.95	125.80 ±2.10	131.05 ±3.98	130.26 ±5.95	125.47 ±5.78
HDL-C, mg/dl	50.67 ±0.97	50.11 ±0.52	50.14 ±0.89	49.71 ±0.98	50.74 ±1.14	50.31 ±0.96	50.43 ±1.54
HDL-C/TOTAL-C	0.41 ±0.02	0.38 ±0.01	0.37 ±0.01	0.40 ±0.03	0.04 ±0.02	0.39 ±0.01	0.39 ±0.02
GOT, U/L	208.73 ±8.67	206.79 ±7.62	205.44 ±6.33	198.40 ±10.32	207.05 ±8.43	216.83 ±5.42	218.40 ±8.96
GPT, U/L	10.95 ±1.67	9.973 ±2.98	12.77 ±2.90	12.10 ±5.50	11.62 ±1.81	11.25 ±4.65	10.3 ±0.40

<sup>1)</sup> Abbreviation : Total-C, total cholesterol; HDL-C, high density-cholesterol; GOT, glutamic-oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic-pyruvic transaminase

<sup>1)</sup> T1, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 100ppm Cu + 0.3ppm Se; T2, 0.1% oligosaccharide +0.5% probiotics + 100ppm Cu + 0.3ppm Se; T3, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 200ppm Cu + 0.3ppm Se; T4, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 100ppm Cu + 1ppm Se; T5, 0.1% oligosaccharide + 0.5% probiotics + 200ppm Cu + 1ppm Se; T6, 0.1% oligosaccharide + 0.7% probiotics + 250ppm Cu + 1.5ppm Se.

<sup>3)</sup> Means ± SE (n=8)



#### 4) 계란 내 콜레스테롤 함량에 미치는 영향

산란계 사료 내 올리고당, 생균제, 구리 및 셀레니움의 혼합 급여가 실험기간 중 난황 콜레스테롤 함량에 미치는 영향에 대해 Table 2-10에 명시하였다.

실험 2주째에 수집한 계란에서는 난황 콜레스테롤, 중성지질 및 인지질 함량에서 처리간에 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 실험 4주째에는 대조구에 비해 모든 처리구에서 난황 콜레스테롤 함량이 유의하게 감소하거나 감소하는 경향을 나타내었으며, 실험 6주째의 계란에서는 모든 처리구 공히 대조구에 비해 난황 콜레스테롤 함량이 유의하게 감소되었다( $P < 0.05$ ). 난황 콜레스테롤의 감소폭은 14.7% (T1 처리구)에서 23.5% (T5 처리구)인 것으로 나타났다. 난황 중성지질 및 인지질 함량에서는 큰 변화가 없었다.

Panda 등(2003)은 생균제의 급여가 난황 콜레스테롤 함량의 감소에 효과가 있다고 하였으며, Kurtoglu 등(2004) 역시 생균제 급여 후에 난황 콜레스테롤 함량의 유의한 감소가 혈중 콜레스테롤의 감소와 동반되어 나타났다고 하였다. 구리를 급여한 연구에서 Pesti와 Bakalli (1998)은 125 ppm과 250 ppm 수준으로 급여했을 때 난황 내 콜레스테롤이 유의하게 감소하였다고 보고하였고, 150 ppm 수준으로도 난황 콜레스테롤 함량이 감소하는 결과가 관찰되었다(Balevi와 Coskun, 2004). 셀레니움의 급여가 난황 콜레스테롤 함량에 영향을 미친다는 연구 결과는 아직 발견하지 못하였다. 본 실험에서도 생균제와 구리 급여에 의해 난황 콜레스테롤 함량이 유의하게 감소하는 결과가 관찰되었는데, 급여 수준별로는 유의한 변화가 없는 것으로 나타났다. 생균제의 급여 수준별로 또는 구리의 급여 수준별로 난황 콜레스테롤 저하에 큰 차이가 없었다는 연구 결과(Panda 등, 2003; Pesti와 Bakalli, 1998)를 고려하면 생균제와 구리 수준의 변화에 따른 저하 효과가 유의한 차이를 보이지 않았던 본 실험의 결과와 일치하는 것으로 생각된다.

Table 2-10. Combination feeding of oligosaccharide, probiotics, copper and selenium on contents of cholesterol, triacylglycerol and phospholipid of egg in laying hens<sup>1,2)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	----- mg/g -----						
2 weeks							
Cholesterol	14.58 ±1.75	13.44 ±1.33	11.68 ±1.18	12.15 ±0.83	10.34 ±0.62	11.43 ±1.22	11.34 ±1.09
Triacylglycerol	204.86 ±3.27	200.45 ±4.01	192.30 ±5.34	192.54 ±10.23	191.55 ±2.12	190.51 ±2.53	196.03 ±1.08
Phospholipid	69.52 ±4.29	66.83 ±1.74	66.60 ±3.42	63.49 ±2.54	67.44 ±2.34	67.94 ±3.54	67.02 ±8.41
4 weeks							
Cholesterol	15.70 ±0.89 <sup>a</sup>	13.09 ±0.68 <sup>abc</sup>	10.08 ±1.43 <sup>c</sup>	13.77 ±0.49 <sup>ab</sup>	11.43 ±1.32 <sup>bc</sup>	11.67 ±1.07 <sup>bc</sup>	12.58 ±0.70 <sup>abc</sup>
Triacylglycerol	196.43 ±2.97	184.74 ±1.57	185.22 ±2.23	179.66 ±9.12	185.72 ±2.53	187.74 ±2.66	186.40 ±7.72
Phospholipid	73.97 ±3.96	75.51 ±1.84	71.04 ±5.12	78.23 ±16.97	79.71 ±3.67	74.36 ±3.15	79.28 ±7.72
6 weeks							
Cholesterol	13.63 ±0.98 <sup>a</sup>	11.63 ±0.58 <sup>b</sup>	10.46 ±0.46 <sup>b</sup>	10.71 ±0.83 <sup>b</sup>	11.51 ±0.73 <sup>b</sup>	10.42 ±0.47 <sup>b</sup>	10.75 ±0.58 <sup>b</sup>
Triacylglycerol	199.74 ±1.97	201.29 ±1.73	198.25 ±5.65	200.85 ±4.30	201.62 ±2.66	201.21 ±3.92	201.84 ±2.41
Phospholipid	80.05 ±4.28	76.67 ±3.12	75.74 ±2.40	69.47 ±1.01	74.07 ±3.72	72.89 ±0.47	74.71 ±2.53

<sup>1)</sup> T1, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 100ppm Cu + 0.3ppm Se; T2, 0.1% oligosaccharide +0.5% probiotics + 100ppm Cu + 0.3ppm Se; T3, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 200ppm Cu + 0.3ppm Se; T4, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 100ppm Cu + 1ppm Se; T5, 0.1% oligosaccharide + 0.5% probiotics + 200ppm Cu + 1ppm Se; T6, 0.1% oligosaccharide + 0.7% probiotics + 250ppm Cu + 1.5ppm Se.

<sup>2)</sup> <sup>a-c</sup> Means ± SE within a row with no common letter are significantly different (P<0.05).

5) HMG-CoA reductase와 VLDL receptor의 mRNA 발현 수준에 미치는 영향  
 산란계 사료 내 올리고당, 생균제, 구리 및 셀레니움의 혼합 급여가 콜레스테롤 대사  
 관련 유전자의 mRNA 발현 수준에 미치는 영향을 Figure 2-1과 2에 명시하였다.  
 대조구에 비하여 T5 처리구를 제외한 모든 처리구에서 HMG-CoA reductase의 발  
 현이 저하된 것으로 나타났다. 처리구의 HMG-CoA reductase의 발현이 저하된 것은  
 계란 내 콜레스테롤 함량이 저하된 것과 연관되어 처리에 따른 콜레스테롤 합성계의  
 저해라고 판단되나 계란 내 콜레스테롤 함량이 감소한 T5 처리구에서 HMG-CoA  
 reductase의 발현이 줄지 않은 것은 명확하게 밝힐 수가 없었으며, VLDL receptor에  
 대한 mRNA의 발현 또한 기대와는 달리 처리간의 큰 차이 나타나 콜레스테롤 함량  
 과의 연관성은 추후 콜레스테롤 대사의 변화와 관련된 콜레스테롤 합성경로, 이화과  
 정 및 배설경로와 연관된 효소들의 발현에 대한 추가적인 연구 부분이 필요할 것으  
 로 사료된다.

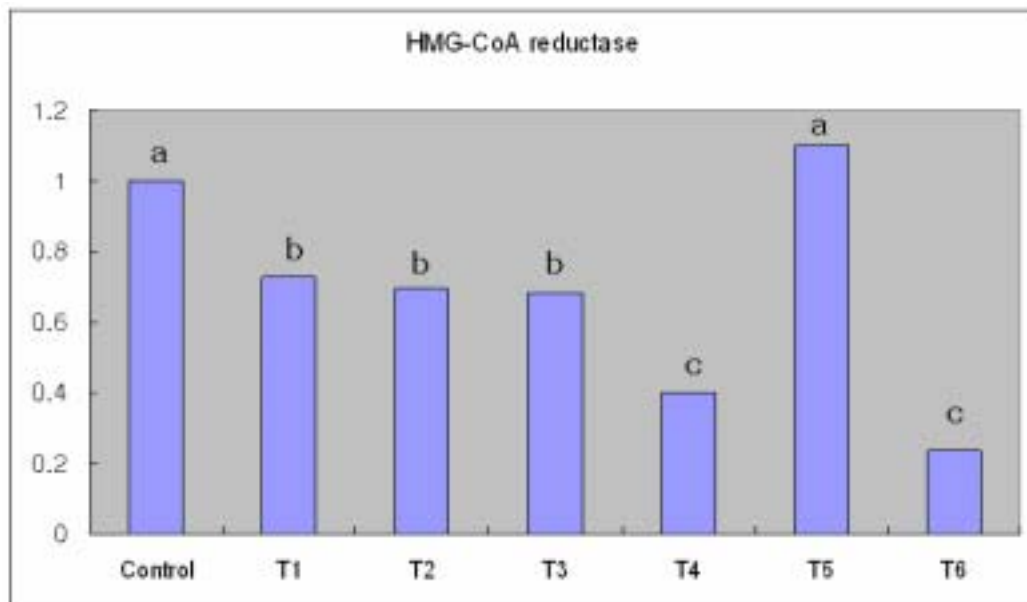


Figure 2-1. Relative levels of HMG-CoA reductase gene expression<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> T1, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 100ppm Cu + 0.3ppm Se; T2, 0.1% oligosaccharide + 0.5% probiotics + 100ppm Cu + 0.3ppm Se; T3, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 200ppm Cu + 0.3ppm Se; T4, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 100ppm Cu + 1ppm Se; T5, 0.1% oligosaccharide + 0.5% probiotics + 200ppm Cu + 1ppm Se; T6, 0.1% oligosaccharide + 0.7% probiotics + 250ppm Cu + 1.5ppm Se.

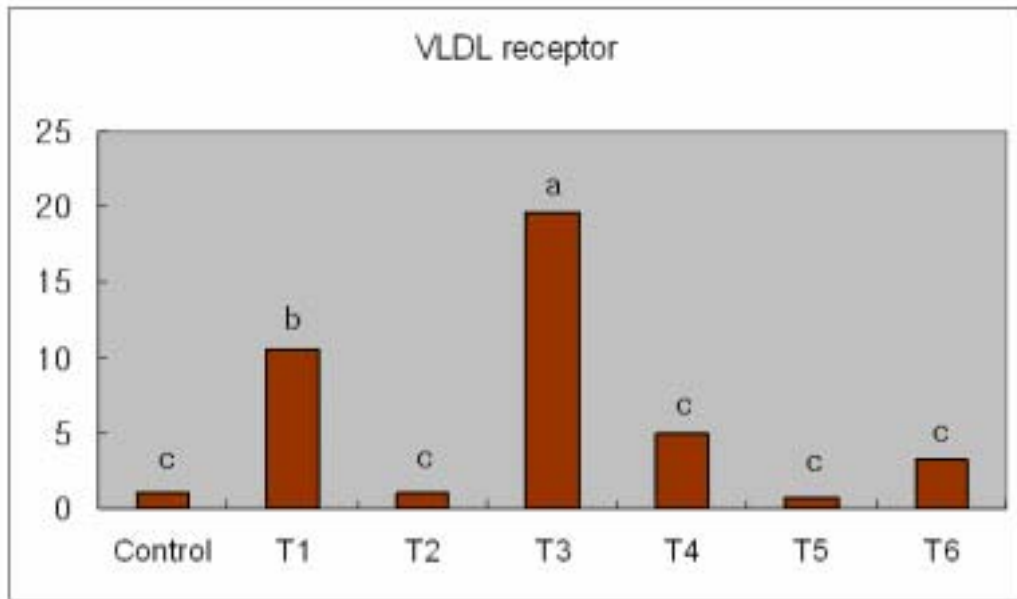


Figure 2-2. Relative levels of VLDL receptor gene expression<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> T1, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 100ppm Cu + 0.3ppm Se; T2, 0.1% oligosaccharide + 0.5% probiotics + 100ppm Cu + 0.3ppm Se; T3, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 200ppm Cu + 0.3ppm Se; T4, 0.1% oligosaccharide + 0.3% probiotics + 100ppm Cu + 1ppm Se; T5, 0.1% oligosaccharide + 0.5% probiotics + 200ppm Cu + 1ppm Se; T6, 0.1% oligosaccharide + 0.7% probiotics + 250ppm Cu + 1.5ppm Se.

3. 미생물제, 천연물질 및 유효광물질의 혼합급여가 계란 콜레스테롤 함량에 미치는 영향 (실험 3)

가. 재료 및 방법

1) 실험 시료

시료로서 사용한 마늘 추출물은 alicin 함량이 7.82%으로 (주)에프에프에이에서 공급받았으며, 구리는 덕산약품공업주식회사에서 구입한 정제 황산구리( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )를 미세 분쇄하여 첨가하였다. 셀레늄은 (주)이지바이오에서 공급받았다. 실험에 사용한 유산균은 (주)엠에스토피아에서 공급받아 사용하였다.

2) 실험 사료

옥수수·대두박을 기초로 하여 대사에너지 2800kcal/kg와 16.1%의 조단백질 그리고 기타 영양소의 수준은 NRC 요구량(1994)에 맞도록 기초사료를 배합하여 대조구 사료로 사용하였다. 처리구 사료는 유산균 0.5%, 마늘추출물 0.5%, 구리 125ppm 및 셀레늄 1ppm을 첨가한 T1처리구, 유산균 1.0%, 마늘추출물 0.5%, 구리 125ppm 및 셀레늄 1ppm을 첨가한 T2처리구, 유산균 0.5%, 마늘추출물 1.0%, 구리 125ppm 및 셀레늄 1ppm을 첨가한 T3처리구, 유산균 0.5%, 마늘추출물 0.5%, 구리 250ppm 및 셀레늄 1ppm을 첨가한 T4처리구, 유산균 0.5%, 마늘추출물 0.5%, 구리 125ppm 및 셀레늄 2ppm을 첨가한 T5처리구, 유산균 1.0%, 마늘추출물 1.0%, 구리 250ppm 및 셀레늄 2ppm을 첨가한 T6처리구로 실험을 실시하였다. (Table 3-1과 3-2)

Table 3-1. Experimental design

	Probiotics, %	Garlic extracts, %	Copper, ppm	Selenium, ppm
Control	-	-	-	-
T1	0.5	0.5	125	1
T2	1.0	0.5	125	1
T3	0.5	1.0	125	1
T4	0.5	0.5	125	2
T5	0.5	0.5	250	1
T6	1.0	1.0	250	2

Table 3-2. Formula and chemical composition of experimental diets<sup>1)</sup>

Ingredients (%)	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Corn	65.52	64.52	64.02	64.02	64.52	64.52	63.52
Lupin seed	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Soybean meal	13.96	13.96	13.96	13.96	13.96	13.96	13.96
Rapeseed meal	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Meat meal	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Limestone	9.51	9.51	9.51	9.51	9.51	9.51	9.51
Dicalcium phosphate	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Tallow	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Choline-chloride (50%)	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
DL-Methionine	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
Mineral mix <sup>2)</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin mix <sup>3)</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Phytase	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
Probiotics	-	0.50	1.00	0.50	0.50	0.50	1.00
Garlic extracts	-	0.50	0.50	1.00	0.50	0.50	1.00
Selenium	-	125ppm	125ppm	125ppm	125ppm	250ppm	250ppm
Copper	-	1ppm	1ppm	1ppm	2ppm	1ppm	2ppm
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	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 <sub>n</sub> , kcal/kg	2,800

<sup>1)</sup> Control, commercial diet; T1, 0.5% lactic acid bacteria (LAB) +0.5% garlic +125ppm Cu+1ppm Se; T2, 1.0% LAB +0.5% garlic +125ppm Cu +1ppm Se; T3, 0.5% LAB +1.0% garlic +125ppm Cu +1ppm Se; T4, 0.5% LAB +0.5% garlic +125ppm Cu +2ppm Se; T5, 0.5% LAB +0.5% garlic +250ppm Cu +1ppm Se; T6, 1.0% LAB +1.0% garlic +250ppm Cu +2ppm Se.

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

<sup>3)</sup> 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, 2.4mg; vitamin B1, 1.2mg; vitamin B2, 4.8mg; vitamin B6, 2.4mg; vitamin B12, 0.02mg; niacin, 15mg; pantothenic acid, 10mg; folic acid, 0.3mg.

### 3) 실험 동물

60주령의 Hy-Line Variety Brown 산란계 암컷을 이용하여 동일한 면적의 산란계 2수용 케이지에 모두 7개 처리구 4반복으로, 총 280수를 선발하여 2주간 일반 시판 사료로 예비사육 하였으며, pen당 산란율이 유사하도록 재배치 한 후 실험에 이용하였으며, 6주간 실험을 실시하였다.

#### 4) 사양 관리

실험 1과 동일하게 시행하였다.

#### 5) 조사 항목

가) 사료섭취량, 난 생산성 및 간 중량  
실험 1과 동일하게 시행하였다.

나) 난질 및 난각질  
실험 1과 동일하게 시행하였다.

다) 혈액 콜레스테롤 농도, 간 기능 관련 효소의 활성과 항산화활성도  
혈액 콜레스테롤 농도와 간 기능 관련 효소의 활성은 실험 1과 동일하게 시행하였고, 항산화 활성은 7주간의 실험 종료 후, 처리구 별로 8수씩 선발한 공시계의 익하 정맥에서 1회용 주사기로 혈액을 채취한 후 원심분리(1500rpm × 15min)하여 혈청을 분리하였으며, Stefan과 Gudrun (1974)의 방법을 응용하여 SOD-like activity를 조사하였다.

먼저 20ml의 glass tube에 pH 8.5인 Tris-HCl buffer (50mM tris, USB Corporation, USA; 10mM EDTA, SIGMA, USA; 35% HCl, (株)松野園製藥所, Japan) 3ml과 준비된 혈청을 0.2ml 첨가하고, 3mM의 pyrogallol (1,2,3-tri-hydroxybenzene, SIGMA, USA)을 0.1ml을 첨가한 후, 25℃에서 30분간 배양하였다 (waterbath WB-1, 國際싸이엔, Korea). 1.0N의 HCl 0.1ml로 반응을 정지시킨 후, spectrophotometer (Uvikon922; Kontron Instruments, Switzerland)를 이용하여 420nm의 흡광도를 측정하였고(At), 동일한 실험방법으로 Tris-HCl buffer와 pyrogallol만 첨가한 후 측정된 흡광도(Ac)와 Tris-HCl buffer와 혈청만 첨가한 후 측정된 흡광도(Ao)를 이용하여 혈액 내 SOD-like activity를 구하였다.

$$\text{SOD-like activity(\%)} = [ 1 - \{ ( Ac - At ) / Ao \} ] \times 100$$

라) 계란 내 지질함량 함량  
실험 2와 동일하게 시행하였다.

마) 장내균총  
5주간의 실험 종료 후, 생체중 측정치의 평균에 해당하는 개체를 처리구 별로 10수씩 선발하여 도살한 후 맹장을 내용물과 함께 적출하여 냉동보관하였다. 이후 멸

균된 생리식염수에 현탁하여 homogenizer로 균질화시킨 다음 적당한 비율로 희석하여 생균수 측정용 시료로 사용하였다. AC의 첨가에 의한 맹장 내의 Total microbes, lactic acid bacteria, *Coli* forms, *Salmonella* spp. 균수를 측정하기 위해 총 세균에는 Total plate agar (Difco)를 lactic acid bacteria 에는 MRS agar를, *Coli* forms 에는 MacConkey agar (Difco)를, *Salmonella* spp.에는 *Salmonella* shigella agar를 사용하였고, 37°C에서 38시간 배양 후 균수측정을 하였다.

바) 콜레스테롤 대사와 관련 유전자들의 mRNA 발현 수준 정량 실험 1과 동일하게 시행하였다.

Table 3-3. Primer sequence of GAPDH, HMG-CoA reductase, Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase and VLDL receptor for real-time PCR

Gene		Primer sequence	Product size(bp)	Anneal (°C)	Cycle
GAPDH	Sense	AAGCTTGTTTCCTGGTATG	264	60	40
	Anti-sense	AGTTTCTATCAGCCTCTCC			
HMG-CoA reductase	Sense	TCCCTGAACCCTCATCTTTG	250	58	40
	Anti-sense	TCTGCAAGAATACGGCTCCT			
Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase	Sense	CATGGCCACATTTTCACTTG	243	58	40
	Anti-sense	TTTGATGAGGGCATCTAGGG			
VLDL receptor	Sense	ACCTCACAATTGATATTGG	161	58	40
	Anti-sense	ACAAGCATGTTTATCATCC			

Table 3-4. Real-time cycler conditions for the lightcycler system

Cycle	Cycle Point
Hold @ 95°C, 15 min 0 secs	
Cycling (40 repeats)	Step 1 @ 94°C, hold 15-30 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 20-30 secs
	Step 3 @ 72°C, hold 30 secs, acquiring to Cycling
Melt (65-95°C), hold 45 secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt	
Hold2 @ 25°C, 1 min 0 secs	

6) 통계 분석

실험 1과 동일한 방법으로 결과를 통계처리 하였다.



## 나. 결과 및 고찰

### 1) 사료섭취량 및 난 생산성에 미치는 영향

산란계 사료 내 LAB, 마늘 추출물, 구리 및 셀레니움의 혼합 급여가 사료섭취량과 난 생산성에 미치는 영향에 대해 Table 3-5에 명시하였다.

사료섭취량, 난 생산성 모두 처리간에 큰 차이는 없는 것으로 나타났다. 우수한 생균제를 선발해서 이용했던 연구에서는 난 생산성이 유의하게 증가하였고(Panda 등, 2003). 산란율의 개선에도 효과가 있는 것으로 보고되었다(Kurtoglu 등, 2004). 구리와 셀레니움의 급여 시험에서도 지나치게 높은 수준으로 실험한 예(al Ankari 등, 1998; Pearce 등, 1983)를 제외하고는 사료섭취량과 난 생산성에 크게 영향을 미치지 않았다.(Pesti와 Bakalli, 1998; Utteback 등, 2005). Payne 등(2005)은 셀레니움을 3.0 ppm으로 증가시켰을 때 난중이 증가하는 효과가 있었다고 하였는데, 이는 본 실험의 결과와 다소 차이가 있는 것으로 생각된다. 본 실험에서는 마늘 추출물을 사용했는데 난 생산성에는 부정적인 영향을 발휘하지 않았음으로서 마늘 분말을 사용하였던 실험 1과 차이가 없는 결과로 판단되었다.

### 2) 난질 및 난각질에 미치는 영향

Table 3-6에는 산란계 사료 내 LAB, 마늘 추출물, 구리 및 셀레니움의 혼합 급여가 사료섭취량과 난 생산성에 미치는 영향에 대해 나타내었다.

난각강도, 난각두께 및 난각색은 처리간에 큰 차이는 없는 것으로 나타났다. 난황색은 T1 및 T5 처리구를 제외하고는 대조구에 비해 유의하게 증가하거나 증가하는 경향을 보였으며, Haugh unit 역시 T3 처리구를 제외하고는 대조구에 비해 유의하게 개선되거나 개선되는 경향을 나타내었다. 생균제의 급여는 난각두께를 향상시키고(Panda 등, 2003), 계란의 파손율을 낮추는 효과(Kurtoglu 등, 2004)가 있음이 보고되었다. 구리를 산란계에 급여한 연구에서는 난각질에 아무런 영향도 미치지 않는 것으로 나타났으며(Balevi와 Costum, 2004; Mabe 등, 2003), Haugh unit를 지표로 조사한 난질에서도 개선효과는 없었던 것으로 보고되었다(Pesti와 Bakalli, 1998). 그러나 무기태 셀레니움을 공급한 연구에서는 난백고의 개선 효과가 시사되었다(Payne 등, 2005). 실험 1에서도 마늘분말과 구리 급여 후 Haugh unit가 개선된 결과가 잘 재현된 것으로 생각되었다.

Table 3-5. Combination feeding of LAB, garlic extract, copper and selenium on feed intake, egg production and liver weight in laying hens<sup>1),2),3)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Feed intake, g/day/bird	94.80 ±7.95	107.02 ±6.41	97.77 ±6.83	99.25 ±4.63	103.34 ±8.28	119.39 ±2.77	115.69 ±9.13
Egg production, %	67.73 ±1.14	72.28 ±4.42	69.35 ±4.79	65.48 ±6.12	65.47 ±5.53	66.85 ±10.47	64.87 ±6.51
Egg weight, g/egg	65.07 ±1.78	66.07 ±2.05	65.98 ±1.98	64.90 ±1.84	66.33 ±2.13	65.47 ±2.37	64.37 ±2.10
Egg mass, g/day/bird	44.13 ±1.51	47.88 ±1.51	45.98 ±4.45	42.77 ±5.10	43.77 ±4.83	44.92 ±7.83	42.17 ±5.39
Liver weight, g/100g BW	1.50 ±0.07	1.48 ±0.05	1.47 ±0.01	1.51 ±0.06	1.50 ±0.03	1.46 ±0.01	1.45 ±0.02

<sup>1)</sup> Abbreviation : LAB, lactic acid bacteria.

<sup>2)</sup> T1, 0.5% lactic acid bacteria (LAB) +0.5% garlic +125ppm Cu+1ppm Se; T2, 1.0% LAB +0.5% garlic +125ppm Cu +1ppm Se; T3, 0.5% LAB +1.0% garlic +125ppm Cu +1ppm Se; T4, 0.5% LAB +0.5% garlic +125ppm Cu +2ppm Se; T5, 0.5% LAB +0.5% garlic +250ppm Cu +1ppm Se; T6, 1.0% LAB +1.0% garlic +250ppm Cu +2ppm Se.

<sup>3)</sup> Mean±SE (n=8).

Table 3-6. Combination feeding of LAB, garlic extract, copper and selenium on egg and eggshell qualities in laying hens<sup>1),2),3)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Eggshell strength, kg/cm <sup>2</sup>	2.66 ±0.13	2.78 ±0.11	2.56 ±0.11	2.54 ±0.09	2.83 ±0.11	2.67 ±0.12	2.89 ±0.13
Eggshell thickness, 0.01mm	33.71 ±0.60	33.56 ±0.53	33.73 ±0.59	32.48 ±1.03	33.01 ±0.79	33.75 ±0.56	33.97 ±0.59
Eggshell color	30.00 ±0.75	28.44 ±0.63	29.02 ±0.59	30.27 ±0.62	28.58 ±0.80	27.84 ±0.77	28.60 ±0.73
Yolk color, R.C.F <sup>3)</sup>	8.73 ±0.10 <sup>cd</sup>	8.80 ±0.10 <sup>cd</sup>	8.87 ±0.93 <sup>bc</sup>	9.18 ±0.09 <sup>a</sup>	9.33 ±0.10 <sup>a</sup>	8.53 ±0.10 <sup>d</sup>	9.11 ±0.09 <sup>ab</sup>
Haugh unit	88.20 ±1.21 <sup>c</sup>	88.29 ±0.82 <sup>bc</sup>	88.99 ±0.93 <sup>abc</sup>	86.55 ±1.05 <sup>c</sup>	91.17 ±0.98 <sup>ab</sup>	91.54 ±1.01 <sup>a</sup>	91.23 ±0.77 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup> Abbreviation : LAB, lactic acid bacteria.

<sup>2)</sup> T1, 0.5% lactic acid bacteria (LAB) +0.5% garlic +125ppm Cu+1ppm Se; T2, 1.0% LAB +0.5% garlic +125ppm Cu +1ppm Se; T3, 0.5% LAB +1.0% garlic +125ppm Cu +1ppm Se; T4, 0.5% LAB +0.5% garlic +125ppm Cu +2ppm Se; T5, 0.5% LAB +0.5% garlic +250ppm Cu +1ppm Se; T6, 1.0% LAB +1.0% garlic +250ppm Cu +2ppm Se.

<sup>3)</sup> Roche color fan.

<sup>a-d</sup> Mean values in a same row with no common superscripts are significantly different (P<0.05).

### 3) 혈액 성분에 미치는 영향

Table 3-7에는 산란계 사료 내 LAB, 마늘 추출물, 구리 및 셀레니움의 혼합 급여가 혈액 성상에 미치는 영향에 대해 나타내었다.

혈중 총 콜레스테롤 농도, GOT 및 GPT 활성에서 처리간에 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 생균제 급여(Kurtoglu 등, 2004; Panda 등, 2003)에 의해 또는 구리 급여(Lim 등, 2006; Pesti와 Bakalli, 1998)에 의해 공시계의 혈중 총 콜레스테롤 농도가 저하되었는데, 이는 본 실험과는 상반된 연구결과이다. 그러나 실험 1과 실험 2에서도 혈중 총 콜레스테롤의 변화가 없었던 것으로 볼 때 이는 이들 물질의 혼합 급여 시에는 각각의 단일 급여의 조건과 다른 반응이 나타날 수 있음을 시사하는 결과로 사료된다.

GOT 및 GPT 활성에서도 처리간에 큰 차이가 없었으며, 이는 실험 1과 실험 2에서 분석한 결과와 일치하였다. 비교적 높은 수준의 생균제, 구리 및 셀레니움의 혼합 급여가 산란계의 생리적 반응에 영향을 미치지 않은 것으로 생각되었다.

SOD-like activity는 체내 항산화 반응의 주요 지표로서 조사하는 항목으로 본 실험에서는 처리간에 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.

Table 3-7. Combination feeding of LAB, garlic extract, copper and selenium on various blood profiles in laying hens<sup>1),2),3)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6
TOTAL-C, mg/dl	138.28 ±6.15	132.99 ±3.07	138.98 ±1.14	120.40 ±3.51	133.44 ±3.90	134.15 ±5.32	136.70 ±9.24
GOT, mg/dl	113.73 ±5.97	116.00 ±4.29	110.70 ±5.17	114.00 ±3.77	119.26 ±3.47	117.82 ±7.88	113.73 ±7.88
GPT, mg/dl	9.50 ±2.49	9.40 ±2.81	10.04 ±1.82	10.18 ±2.45	7.00 ±0.81	8.54 ±1.60	8.54 ±1.60
S.O.D like activity	60.82 ±6.30	56.62 ±5.28	65.17 ±9.72	65.01 ±6.25	57.30 ±6.44	59.81 ±5.28	72.65 ±5.68

<sup>1)</sup> Abbreviation : LAB, lactic acid bacteria.; TOTAL-C, total cholesterol; HDL-C, high density-cholesterol; GOT, glutamic-oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic-pyruvic transaminase.

<sup>2)</sup> T1, 0.5% lactic acid bacteria (LAB) +0.5% garlic +125ppm Cu+1ppm Se; T2, 1.0% LAB +0.5% garlic +125ppm Cu +1ppm Se; T3, 0.5% LAB +1.0% garlic +125ppm Cu +1ppm Se; T4, 0.5% LAB +0.5% garlic +125ppm Cu +2ppm Se; T5, 0.5% LAB +0.5% garlic +250ppm Cu +1ppm Se; T6, 1.0% LAB +1.0% garlic +250ppm Cu +2ppm Se.

<sup>3)</sup> Mean±SE (n=8).

#### 4) 계란 내 지질 함량에 미치는 영향

산란계 사료 내 LAB, 마늘 추출물, 구리 및 셀레니움의 혼합 급여가 난황 내 지질 분획 함량에 미치는 영향에 대해 Table 3-8에 나타내었다.

실험 2주째에 수집한 계란에서는 난황 콜레스테롤 함량에서 유의한 차이 없이 다소 감소하는 경향을 나타내었으나, 실험 4주째 및 6주째에 수집한 계란에서는 대조구에 비해 난황 콜레스테롤 함량이 유의하게 감소하거나 감소하는 경향을 나타내었다. 중성지질 및 인지질 함량에서는 처리간에 유의한 차이가 인정되었으나 처리별로 일정한 경향을 보이지는 않았다. 실험 6주째 계란에서는 T1 처리구를 제외하고 난황 콜레스테롤의 감소폭은 적게는 13.5% (T4 처리구)에서 약 29.8% (T3 처리구)까지 감소한 것으로 나타났다.

생균제, 구리 및 마늘 추출물의 급여에 의한 난황 콜레스테롤 저하와 관련된 연구 자료는 실험 1과 실험 2에서 충분히 서술하였다. al Ankari 등(1998)은 150 ppm의 구리를 급여했을 때 대조구에 비해 난황 콜레스테롤이 약 14% 정도 감소하였다고 보고하였는데, 본 실험에서는 최대 30% 수준까지 난황 콜레스테롤 수준을 낮출 수 있었다. 실험 2의 결과와 종합적으로 본다면 난황 콜레스테롤 함량을 감소시키는 데 효과적인 성분들을 혼합 급여했을 때 약 25-30% 정도의 콜레스테롤을 감소시키는 것이 가능하다고 생각된다.

#### 5) 장내 균총에 미치는 영향

산란계 사료 내 LAB, 마늘 추출물, 구리 및 셀레니움의 혼합 급여가 장내 균총에 미치는 영향에 대해 Table 3-9에 나타내었다. 총균, 대장균 및 살모넬라 수에서는 처리간에 큰 차이가 없었으나 *Lactic acid bacteria* 수는 대조구에 비해 모든 처리구에서 유의하게 증가하였으며, 이는 사료 내 LAB 급여 효과로 생각된다.

Table 3-8. Combination feeding of LAB, garlic extract, copper and selenium on contents of lipid fractions of egg in laying hens<sup>1,2)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	----- mg/g -----						
2 weeks							
Cholesterol	14.31 ±0.48	12.39 ±0.55	12.31 ±0.44	12.85 ±1.19	13.00 ±0.52	13.69 ±1.61	13.50 ±0.73
Triacylglycerol	203.59 ±2.66 <sup>a</sup>	198.29 ±5.76 <sup>ab</sup>	198.56 ±3.60 <sup>ab</sup>	187.47 ±3.27 <sup>abc</sup>	202.97 ±4.69 <sup>a</sup>	182.86 ±8.10 <sup>bc</sup>	177.51 ±7.61 <sup>c</sup>
Phospholipid	67.28 ±2.15 <sup>ab</sup>	55.00 ±1.38 <sup>c</sup>	60.84 ±2.63 <sup>bc</sup>	60.68 ±2.82 <sup>bc</sup>	71.88 ±2.84 <sup>a</sup>	69.98 ±4.65 <sup>a</sup>	72.26 ±2.70 <sup>a</sup>
4 weeks							
Cholesterol	12.54 ±0.52 <sup>ab</sup>	11.35 ±0.69 <sup>bc</sup>	10.22 ±0.36 <sup>c</sup>	11.55 ±0.49 <sup>abc</sup>	12.76 ±0.47 <sup>ab</sup>	13.21 ±0.22 <sup>a</sup>	11.73 ±0.18 <sup>abc</sup>
Triacylglycerol	200.97 ±3.52 <sup>a</sup>	192.66 ±5.48 <sup>ab</sup>	200.14 ±4.07 <sup>a</sup>	179.21 ±3.08 <sup>b</sup>	203.11 ±5.23 <sup>a</sup>	196.92 ±4.66 <sup>a</sup>	192.63 ±4.44 <sup>ab</sup>
Phospholipid	60.85 ±4.09	60.63 ±3.88	64.83 ±6.24	60.67 ±4.95	63.72 ±2.41	62.08 ±3.69	62.59 ±3.83
6 weeks							
Cholesterol	13.24 ±1.44 <sup>a</sup>	12.78 ±0.42 <sup>a</sup>	11.15 ±0.80 <sup>ab</sup>	9.30 ±0.63 <sup>b</sup>	11.46 ±0.70 <sup>ab</sup>	9.84 ±0.52 <sup>b</sup>	9.84 ±0.53 <sup>b</sup>
Triacylglycerol	192.63 ±1.98	196.05 ±1.65	196.72 ±4.22	181.88 ±2.97	197.08 ±3.93	191.54 ±5.54	188.34 ±3.98
Phospholipid	71.87 ±2.94 <sup>a</sup>	69.55 ±2.17 <sup>a</sup>	65.68 ±2.44 <sup>ab</sup>	65.24 ±2.93 <sup>ab</sup>	64.62 ±2.90 <sup>ab</sup>	66.88 ±4.58 <sup>a</sup>	57.32 ±2.09 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> Abbreviation : LAB, lactic acid bacteria.

<sup>2)</sup> T1, 0.5% lactic acid bacteria (LAB) +0.5% garlic +125ppm Cu+1ppm Se; T2, 1.0% LAB +0.5% garlic +125ppm Cu +1ppm Se; T3, 0.5% LAB +1.0% garlic +125ppm Cu +1ppm Se; T4, 0.5% LAB +0.5% garlic +125ppm Cu +2ppm Se; T5, 0.5% LAB +0.5% garlic +250ppm Cu +1ppm Se; T6, 1.0% LAB +1.0% garlic +250ppm Cu +2ppm Se.

<sup>a-c</sup> Mean values in a same row with no common superscripts are significantly different (P<0.05).

Table 3-9. Combination feeding of LAB, garlic extract, copper and selenium on intestinal microflora in laying hens<sup>1),2)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Total microbes, <i>log</i> cfu/g	7.74 ±0.03	7.64 ±0.06	7.71 ±0.01	7.58 ±0.04	7.68 ±0.02	7.71 ±0.01	7.65 ±0.05
Lactic acid bacteria, <i>log</i> cfu/g	6.19 ±0.17 <sup>d</sup>	6.71 ±0.13 <sup>bc</sup>	7.03 ±0.56 <sup>a</sup>	6.74 ±0.30 <sup>bc</sup>	6.72 0.03 <sup>bc</sup>	6.52 ±0.14 <sup>c</sup>	6.90 ±0.07 <sup>ab</sup>
<i>Coli.</i> forms, <i>log</i> cfu/g	6.78 ±0.08	6.82 ±0.04	6.62 ±0.08	6.62 ±0.07	6.90 ±0.08	6.78 ±0.03	6.81 ±0.07
<i>Salmonella</i> sp., <i>log</i> cfu/g	5.45 ±0.10	5.27 ±0.10	5.35 ±0.16	5.22 ±0.16	5.29 ±0.07	5.27 ±0.10	5.36 ±0.06

<sup>1)</sup> Abbreviation : LAB, lactic acid bacteria.

<sup>2)</sup> T1, 0.5% lactic acid bacteria (LAB) +0.5% garlic +125ppm Cu+1ppm Se; T2, 1.0% LAB +0.5% garlic +125ppm Cu +1ppm Se; T3, 0.5% LAB +1.0% garlic +125ppm Cu +1ppm Se; T4, 0.5% LAB +0.5% garlic +125ppm Cu +2ppm Se; T5, 0.5% LAB +0.5% garlic +250ppm Cu +1ppm Se; T6, 1.0% LAB +1.0% garlic +250ppm Cu +2ppm Se.

<sup>a-d</sup> Mean values in a same row with no common superscripts are significantly different (P<0.05).

6) 콜레스테롤 대사와 관련 유전자들의 mRNA 발현 수준에 미치는 영향  
 산란계 사료 내 LAB, 마늘 추출물, 구리 및 셀레니움의 혼합 급여가 난황 내 각 지질 분획 함량에 미치는 영향에 대해 Figure 3-1, 3-2 및 3-3에 나타내었다. LAB, 마늘 추출물, 구리 및 셀레니움을 혼합 급여한 모든 처리구의 간 HMG-CoA reductase와 Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase의 발현이 모두 감소한 것으로 나타났다. 난포의 VLDL receptor의 발현은 실험 1, 2와 마찬가지로 변이가 큰 것으로 나타났다. HMG-CoA reductase는 실험 1, 2에서의 결과와 유사하게 계란 내 콜레스테롤 함량의 감소와 연관된 것으로 나타났으며, 콜레스테롤의 배설 형태인 담즙산 합성과 연관된 cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase는 콜레스테롤 생합성 경로의 율속효소인 HMG-CoA reductase의 감소와 유사한 경향을 나타내었다.

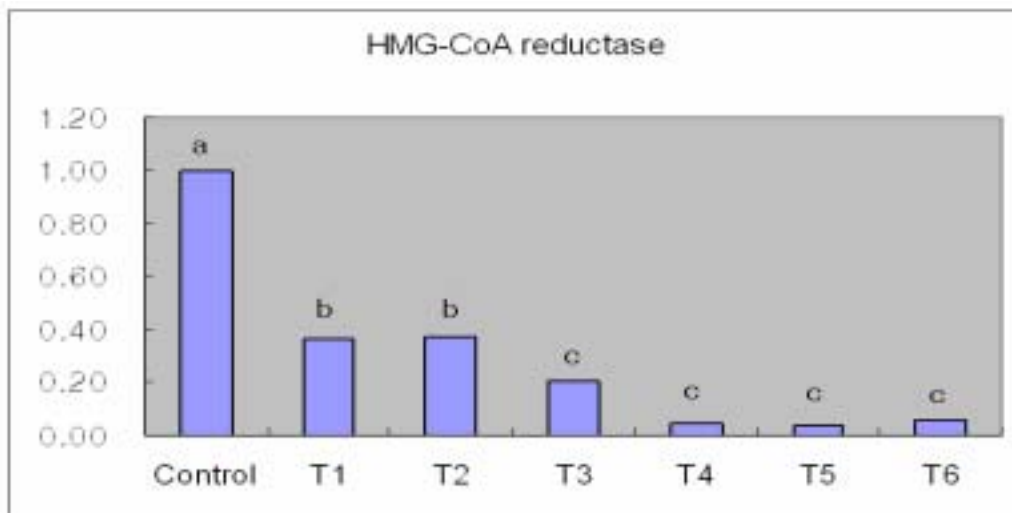


Figure 3-1. Relative levels of liver HMG-CoA reductase gene expression<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> T1, 0.5% lactic acid bacteria (LAB) +0.5% garlic +125ppm Cu+1ppm Se; T2, 1.0% LAB +0.5% garlic +125ppm Cu +1ppm Se; T3, 0.5% LAB +1.0% garlic +125ppm Cu +1ppm Se; T4, 0.5% LAB +0.5% garlic +125ppm Cu +2ppm Se; T5, 0.5% LAB +0.5% garlic +250ppm Cu +1ppm Se; T6, 1.0% LAB +1.0% garlic +250ppm Cu +2ppm Se.



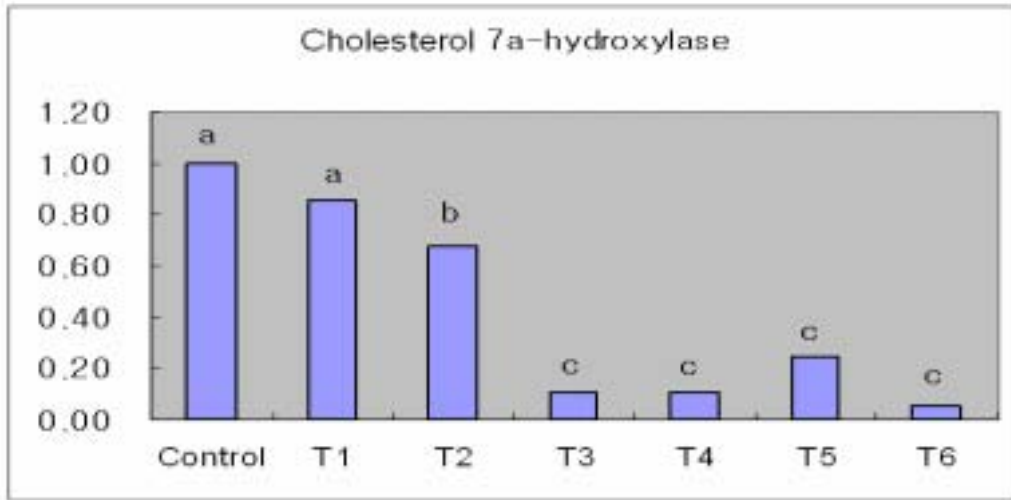


Figure 3-2. Relative levels of liver Cholesterol 7a-hydroxylase gene expression<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> T1, 0.5% lactic acid bacteria (LAB) +0.5% garlic +125ppm Cu+1ppm Se; T2, 1.0% LAB +0.5% garlic +125ppm Cu +1ppm Se; T3, 0.5% LAB +1.0% garlic +125ppm Cu +1ppm Se; T4, 0.5% LAB +0.5% garlic +125ppm Cu +2ppm Se; T5, 0.5% LAB +0.5% garlic +250ppm Cu +1ppm Se; T6, 1.0% LAB +1.0% garlic +250ppm Cu +2ppm Se.

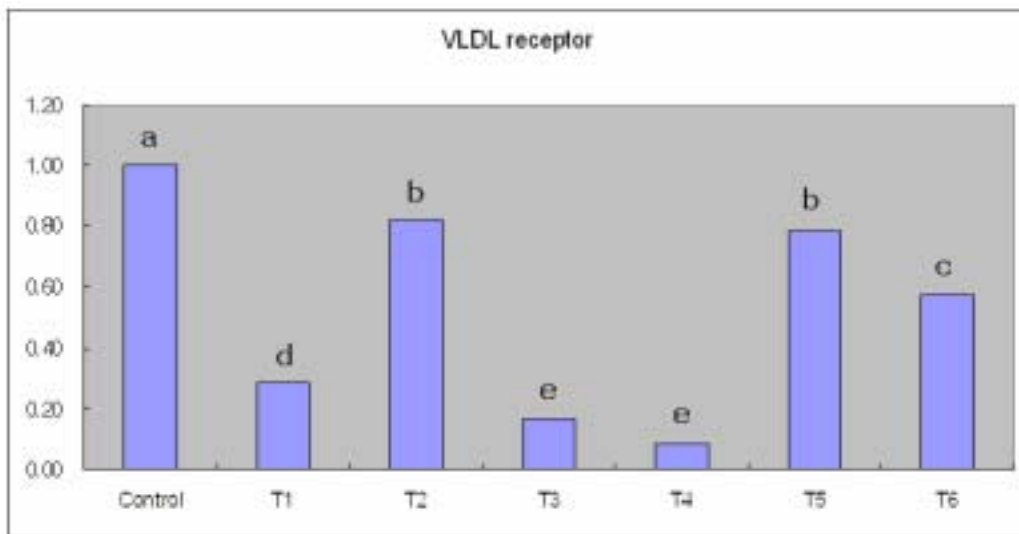


Figure 3-3. Relative levels of liver VLDL-receptor gene expression<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> T1, 0.5% lactic acid bacteria (LAB) +0.5% garlic +125ppm Cu+1ppm Se; T2, 1.0% LAB +0.5% garlic +125ppm Cu +1ppm Se; T3, 0.5% LAB +1.0% garlic +125ppm Cu +1ppm Se; T4, 0.5% LAB +0.5% garlic +125ppm Cu +2ppm Se; T5, 0.5% LAB +0.5% garlic +250ppm Cu +1ppm Se; T6, 1.0% LAB +1.0% garlic +250ppm Cu +2ppm Se.

## 제 2 절 유효성분 함유 고부가가치 계란생산을 위한 연구 (제 2 세부과제)

1. 무기태 또는 유기태 셀레늄 및 구리의 첨가가 계란 내 셀레늄 및 구리 함량에 미치는 영향 (실험 1)

가. 재료 및 방법

1) 실험 시료

시료로서 사용한 유기태 셀레니움은 (주)올텍에서 공급받았으며, 무기태 셀레니움은 한양미네랄에서 공급받았다. 유기태 구리는 (주)미래자원에서 공급받았으며, 무기태 구리는 덕산약품 공업주식회사에서 구입한 정제 황산구리( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )를 미세분쇄하여 첨가하였다.

2) 실험 사료

옥수수·대두박을 기초로 하여 대사에너지 2800kcal/kg와 16.1%의 조단백질 그리고 기타 영양소의 수준은 NRC 요구량(1994)에 맞도록 기초사료를 배합하여 대조구 사료로 사용하였다. 처리구 사료는 유기태 셀레니움 0.3ppm을 첨가한 T1 처리구, 유기태 셀레니움을 1.0ppm 첨가한 T2 처리구, 무기태 셀레니움을 1.0ppm을 첨가한 T3 처리구, 유기태 구리 125ppm을 첨가한 T4 처리구, 유기태 구리 250ppm을 첨가한 T5 처리구 5% 첨가한 처리구, 무기태 구리 250 ppm 첨가한 T6 처리구를 두어 실험을 실시하였다. (Table 1-1과 1-2)

Table 1-1. Experimental design

	Organic Se	Inorganic Se	Organic Cu	Inorganic Cu
		----- ppm -----		
Control	-	-	-	-
T1	0.3	-	-	-
T2	1.0	-	-	-
T3	-	1.0	-	-
T4	-	-	125	-
T5	-	-	250	-
T6	-	-	-	250

Table 1-2. Formula and chemical composition of experimental diets<sup>1)</sup>

Ingredients (%)	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Corn	65.52	65.22	64.52	64.52	65.52	65.52	65.52
Lupin seed	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Soybean meal	13.96	13.96	13.96	13.96	13.96	13.96	13.96
Rapeseed meal	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Meat meal	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Limestone	9.51	9.51	9.51	9.51	9.51	9.51	9.51
Dicalcium phosphate	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Tallow	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Choline-chloride (50%)	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
DL-Methionine	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
Mineral mix <sup>2)</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin mix <sup>3)</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Phytase	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
Organic selenium	-	0.3ppm	1.0ppm	-	-	-	-
Inorganic selenium	-	-	-	1.0ppm	-	-	-
Organic copper	-	-	-	-	125ppm	250ppm	-
Inorganic copper	-	-	-	-	-	-	250ppm
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	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 <sub>n</sub> , kcal/kg				2,800			

<sup>1)</sup> Control, commercial diet; T1, 0.3ppm organic selenium; T2, 1.0ppm organic selenium; T3, 1.0ppm Inorganic selenium; T4, 125ppm organic copper; T5, 250ppm organic copper; T6, 250ppm Inorganic copper.

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

<sup>3)</sup> 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, 2.4mg; vitamin B1, 1.2mg; vitamin B2, 4.8mg; vitamin B6, 2.4mg; vitamin B12, 0.02mg; niacin, 15mg; pantothenic acid, 10mg; folic acid, 0.3mg.

### 3) 실험 동물

67주령의 Lohmann Brown 산란계 암컷을 이용하여 동일한 면적의 산란계 2수용 케이지에 모두 7개 처리구 5반복으로, 총 350수를 선발하여 2주간 일반 시판 사료로 예비사육 하였으며, pen당 산란율이 유사하도록 재배치 한 후 실험에 이용하였으며, 5주간 실험을 실시하였다.

### 4) 사양 관리

본 실험은 온도와 점등을 조절할 수 있는 산란계 시험용 유창 계사에서 실시하였으며, 물과 사료는 자유 채식시켰다. 기타 일반적인 사양관리는 관행적인 방법에 준하여 실시하였다. 수당 급이 면적과 pen당 급수기 숫자는 동일하도록 하였고, 시험 전 기간 동안 점등은 16L:8D로 일정하게 유지하였다.

### 5) 조사 항목

#### 가) 사료섭취량, 난 생산성과 간 중량

사료섭취량은 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, 수집된 정상란 진부를 칭량하여 정상 계란수로 나누어 평균 난중을 산출하였다. 실험 종료 시에 처리구의 반복구 별로 2수씩 선발하여 도살한 후 간을 채취하여 중량을 측정하였고 생체중 100g당 상대적인 중량으로 환산하였다.

#### 나) 난질 및 난각질

실험 사료 급여 후 매주 생산된 계란 중 평균치에 해당하는 계란을 수집하여 난각 강도, 난각두께 및 Haugh unit 등 계란의 내부 난질 및 난각질 관련 항목을 측정하였다.

난각 강도는 난각 강도계(FHK 卵殼強度計, 富士乎工業株式會社)를 이용하여 계란의 둔단부를 위로하고 수직으로 고정한 후 압력을 가하여 파각되는 순간의 압력을 측정하였다. 난각 강도 측정 후 난백의 높이를 조사하여 난중을 대비한 Haugh unit 수치를 구하였다(FHK 卵白測定台, 富士乎工業株式會社). 난각 두께는 계란의 중앙부 난각 파편을 채취하여 난각 후도계(FHK Peacock, 富士乎工業株式會社)를 통해 측정된 두께의 평균치로 하였다.

#### 다) 혈액 콜레스테롤 농도, 간 기능 관련 효소의 활성

5주간의 실험 종료 후, 처리구 별로 8수씩 선발한 공시계의 익하 정맥에서 1회용

주사기로 혈액을 채취한 후 원심분리(1500rpm × 15min)하여 혈청을 분리하였으며, 진단용 콜레스테롤 kit (콜레스테롤 E kit, HDL-콜레스테롤 kit, 영동제약)를 사용하여 비색방법으로 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 농도를 측정하였다.

혈청 내의 glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) 및 glutamic-pyruvic transaminase (GPT) 함량은 GOT-GPT kit (GOT-GPT 측정용 kit, 영동제약)를 사용하여 비색방법으로 측정하였다.

라) 계란 내 셀레니움 및 구리 함량

실험 5주째 얻은 계란을 할란하여 난황만 취한 후 homogenizer로 난황을 균질하게 갈아 시료로 이용하였으며, 구리의 분석은 ICP 분석법으로 검정하였으며 구리의 표준용액은 1000ppm의 ICP용 구리 표준용액을 사용하였으며 단계별 표준 용액은 2.5% 질산용액으로 희석하였다. 시료 진처리는 시료 5g을 자제크루시블에 칭량하여 예비회화 시킨 후 600℃ 전기회화로에서 2시간 이상 회화(회백색) 시켰다. 방냉하고 HCl(1:1)로 20 ml 넣어 하룻밤 방치 후 100 ml 메스플라스크에 붓고 표선을 맞춘뒤 No.6 여과지로 여과했다. 분석을 위해 플라즈마 원자발광분광분석장치(Inductively coupled plasma spectrometer : Jobin Yvon, Ultima plus, France)을 사용했으며 분석파장 324.754 nm에서 분석하였다. 표준액은 분석물질의 농도가 검량선의 중앙에 오도록 조정하여 3-4단계로 실내온도의 조건에서 제조하였으며 matrix는 2.5% 질산으로 하였다. 기기분석을 위한 조건은 Table 1-3과 같다.

$$\text{구리의 함량(ppm)} = \text{분석치(ppm)} \times \text{희석량(ml)}/\text{시료량(g)}$$

Table 1-3. Analytical condition of HPLC for copper

Operating condition			
Power	1000	Measure points	9
Plasma flow	PI	Calculate point	5
Sheath flow $\mu$ /min	0.2	Integration time sec	0.5
Auxiliary flow	0	Entrance slit $\mu$ m	20
Pump speed	20	Exit slit $\mu$ m	15
Aron humidification	Yes	Increment nm	0.003
Nebulizer flower l/min	0.66	Analysis mode	gauss
Nebulize pressure bar	3.0	Line nm	324.754

셀레니움의 분석은 ICP 분석법으로 검정하였으며 셀레니움 원소는 낮은 온도(85°C)에서 날아가기 때문에 증발을 방지할 수 있는 고압초단분해와 적합한 용해산 실험을 통해 설정하였다. 시료 1g 정도를 teflon vessel에 넣고 여기에 HNO<sub>3</sub> 7ml, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1ml를 넣고 충분히 혼합후 12시간 방치한다. 초단파분해를 마치고 냉각된 시료를 25ml flask에 넣고 make-up 하여 No.6 여과지로 여과했다. 표준액도 같은 용액을 이용해 제조하였다. 분석을 위해 플라즈마 원자발광분광분석장치(Inductively coupled plasma spectrometer : Jobin Yvon, Ultima plus, France)을 사용했으며 분석파장 196.026 nm에서 분석하였다. 표준액은 분석물질의 농도가 검량선의 중앙에 오도록 조정하여 3-4단계로 실내온도의 조건에서 제조하였으며 matrix는 2.5% 질산으로 하였다. 기기분석을 위한 조건은 Table 1-4과 같다.

셀레니움의 함량은(ppm) 분석치(ppm) × 회석량(ml)/시료량(g)

Table 1-4. Analytical condition of HPLC for selenium

Operating condition			
Power	1000	Measure points	5
Plasma flow	PI	Calculate point	1
Sheath flow $\mu$ /min	0.2	Integration time sec	3
Auxiliary flow	0	Entrance slit $\mu$ m	20
Pump speed	20	Exit slit $\mu$ m	15
Aron humidification	Yes	Increment nm	0.002
Nebulizer flower l/min	0.6	Analysis mode	max
Nebulize pressure bar	3.0	Line nm	196.026

마) 생산된 계란의 관능검사

실험 5주째 얻은 계란을 할란하여 난황만 취한 후 homogenizer로 난황을 균질하게 갈아 시료로 이용하였으며, 시료를 1±0.2 cm의 일정한 두께로 정형하여 150°C로 예열된 전기그릴(HOBART, CG20-1, USA)위에 놓고 중심온도가 45°C에 이르렀을 때 뒤집어 가열하여 최종 중심온도가 72°C에 도달했을 때 꺼내어 일정한 크기로 썰어서 관능평가 시료로 이용하였으며, 관능평가의 경험이 있는 6명의 관능평가 요원을 구성하여 가열 조리된 시료에 대하여 연도, 맛, 풍미, 다즙성을 9 point hedonic scale에 의해 조사하였다.

#### 6) 통계 분석

모든 얻어진 결과에 대한 통계분석은 Statistical Analysis System(SAS, 2002)의 General Linear Model (GLM) Program을 이용하여 실시하였고 분산분석상에 통계적인 유의차가 인정될 때 Duncan의 multiple range test를 이용하여 처리간의 유의성을 검정하였다(Duncan, 1955).

나. 결과 및 고찰

1) 사료섭취량 및 난 생산성에 미치는 영향

사료 내 유기태 및 무기태 Se와 Cu의 급여가 사료섭취량 및 난 생산성에 미치는 영향에 대해 Table 1-5에 나타내었다. 사료섭취량, 산란율, 난중 및 일산란량에서는 처리간에 큰 차이가 없었으며, 간의 상대적 중량에서도 처리간에 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

구리의 첨가 수준을 250 ppm으로 설계하였던 선행연구에서는 난 생산성이 저하되었다는 결과(al Ankarı 등, 1998)와 영향이 없었다는 결과(Pesti와 Bakalli, 1998)가 모두 보고되었으나 본 실험에서는 부정적인 영향이 없는 것으로 나타났다. Payne 등(2005)이 셀레늄을 3.0 ppm으로 증가시켰을 때 난중이 증가하는 효과가 있었다고 하였는데, 본 실험에서는 난중에서 유의한 차이가 발견되지 않았다.

Table 1-5. Effects of dietary Se and Cu on feed intake, egg production and liver weight in laying hens<sup>1,2)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Feed intake, g/hen/day	137.9	139.8	136.4	140.5	136.4	136.0	138.9
Egg production, %	75.8	70.9	75.2	71.2	73.8	75.3	76.5
Egg weight, g/egg	68.3	66.1	68.8	68.8	68.3	68.5	68.9
Liver weight, g/100g BW.	1.87	1.74	1.75	1.68	1.79	1.85	1.75

<sup>1)</sup> Control, commercial diet; T1, 0.3ppm organic selenium; T2, 1.0ppm organic selenium; T3, 1.0ppm inorganic selenium; T4, 125ppm organic copper; T5, 250ppm organic copper; T6, 250ppm inorganic copper.

<sup>2)</sup> Mean (n=8).

2) 난질 및 난각질에 미치는 영향

Table 1-6에는 사료 내 유기태 및 무기태 Se와 Cu의 급여가 난질 및 난각질에 미치는 영향에 대하여 명시하였다. 난각강도, 난각두께, 난황색 및 Haugh unit 등 본 실험에서 조사한 모든 난질 및 난각질 관련 지표에서 처리간에 유의한 차이는



나타나지 않았다. Se과 Cu의 첨가 형태(무기태 vs. 유기태)에 따른 영향도 없는 것으로 생각되었다.

Payne 등(2005)는 무기태 Se를 첨가 급여했을 때 난백고가 개선되었다고 하였는데, 본 실험에서는 Haugh unit에 큰 변화가 없었다. Cu를 산란계에 급여한 연구에서는 난질(Pesti와 Bakalli, 1998)과 난각질(Balevi와 Costum, 2004; Mabe 등, 2003)에 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 보고되었다.

Table 1-6. Effects of dietary Se and Cu on egg and eggshell qualities in laying hens<sup>1),2)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Egg strength, kg/cm <sup>2</sup>	3.02	3.05	2.91	2.92	3.49	3.06	3.07
Egg thickness, 0.01mm	36.88	36.93	37.13	36.11	37.09	36.48	37.65
yolk color, RCF	8.67	8.58	8.60	8.49	8.56	8.57	8.50
Haugh unit	65.77	65.80	63.50	63.12	65.80	66.21	65.88

<sup>1)</sup> Control, commercial diet; T1, 0.3ppm organic selenium; T2, 1.0ppm organic selenium; T3, 1.0ppm inorganic selenium; T4, 125ppm organic copper; T5, 250ppm organic copper; T6, 250ppm inorganic copper.

<sup>2)</sup> Mean (n=8).

### 3) 혈액 성분 에 미치는 영향

사료 내 유기태 및 무기태 Se와 Cu의 급여가 혈액 성분 에 미치는 영향 에 대해 Table 1-7에 나타내었다. 총 콜레스테롤 및 HDL-C 농도 모두 처리 간에 큰 차이가 없었으며, 유효 광물질의 첨가 형태에 따른 영향도 없는 것으로 나타났다. GOT 및 GPT 활성에서도 처리 간에 큰 차이가 없었다.

Lim 등(2006) 및 Pesti와 Bakalli (1998)는 Cu 급여 후에 공시계의 혈액 내 콜레스테롤 농도가 감소하는 결과를 관찰하였으나, 본 실험에서는 제 1 세부과제의 결과들과 일관되게 총 콜레스테롤 및 HDL-C의 농도에서 큰 변화가 나타나지 않았다. 조직 손상의 지표인 GOT 및 GPT 수주에서는 처리 간에 큰 차이가 없었으며, 이는

유기태 또는 무기태 Se 및 Cu의 공급이 산란계에게 독성을 발휘할 정도의 수준이 아니었음을 시사하는 결과이다. GOT 및 GPT 활성에 미치는 영향에 대한 결과는 제 1 세부과제의 결과와 잘 일치하였다.

Table 1-7. Effects of dietary Se and Cu on various blood profiles in laying hens<sup>1,2)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6
TOTAL-C, mg/dl	99.79	91.29	92.43	100.95	96.32	104.15	101.14
HDL-C, mg/dl	6.66	6.11	7.36	7.28	9.38	8.33	8.35
GOT, U/dl	208.81	195.27	207.60	196.69	200.97	211.49	202.92
GPT, U/dl	16.20	16.58	14.73	16.26	15.50	14.19	15.21

<sup>1)</sup> Control, commercial diet; T1, 0.3ppm organic selenium; T2, 1.0ppm organic selenium; T3, 1.0ppm inorganic selenium; T4, 125ppm organic copper; T5, 250ppm organic copper; T6, 250ppm inorganic copper.

<sup>2)</sup> Mean (n=8).

#### 4) 계란 내 Se 및 Cu 함량에 미치는 영향

사료 내 유기태 및 무기태 Se와 Cu의 급여가 계란 내 이들 유효 광물질 함량에 미치는 영향에 대해 Table 1-8에 나타내었다. Cu는 사료 내 첨가수준에 따라 증가하는 경향이 관찰되었으나 유의한 차이는 인정되지 않았다. Se는 사료 내 첨가 수준이 증가함에 따라 계란 내 전이량도 유의하게 증가한 것으로 나타났다. T2 (유기태)와 T3 (무기태) 처리구에서는 Se 공급 수준이 1.0 ppm으로 동일하였으나 유의한 차이 없이 T2에서 다소 높았다. 이는 유기태 형태로의 공급이 무기태로서 공급하는 것보다 효율적임을 시사하는 결과이다.

산란계 사료 내 Se의 추가 공급했을 때 계란 내 Se 함량이 증가하는 결과는 다른 연구에서도 확인된 바 있다. Payne 등(2005)은 유기태 및 무기태 Se 공급 수준에 따라 비례하여 계란 내 Se 함량이 증가한다고 보고하였고, 유기태 Se의 전이 효율이 무기태 Se에 비해 높다고 하였다. 반면 Jiakui와 Xiaolong (2004)은 무기태와

유기태 Se간에 전이율에서는 큰 차이가 없으며 산란계에서 유사한 체내 대사경로를 거치는 것으로 추찰하였다. Utterback 등(2005)은 다양한 수준의 Se를 공급한 연구에서 계란 내 Se 함량이 대조구에 비해 2.8배 증가한다고 하였다. 이는 본 실험에서 약 2배 정도 증가한 것에 비하면 전이율이 다소 높은 결과이다.

Se와는 대조적으로 사료 내 Cu는 계란 내로의 전이가 충분히 일어나지 않는 듯하다. Skrivan 등(2005)은 Cu가 Zn 및 Fe에 비해 계란 내 전이가 비효율적이라고 하였으며, 35ppm의 Cu를 추가 공급한 후속연구에서 유의한 차이는 인정되었으나 계란 내 Cu 함량이 26% 정도만 증가하였다고 보고하였다. 본 실험에서는 T5 첨가구에서 계란 내 Cu 함량이 대조구에 비해 30% 정도 증가하였으나 통계적으로 유의한 수준은 아니었다.

#### 5) 관능적 특성에 미치는 영향

사료 내 유기태 및 무기태 Se와 Cu의 급여가 계란의 관능적 특성에 미치는 영향에 대한 결과를 Table 1-9에 나타내었다. 계란의 풍미 및 전체적 선호도에서 처리간에 큰 차이는 없었으며, 이는 유기태 및 무기태 Se와 Cu의 급여가 생산된 계란의 관능적 특성에 부정적인 영향을 미치지 않음을 의미한다.

Table 1-8. Effects of dietary Se and Cu on the their transfer into eggs in laying hens<sup>1),2)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Se, ppm	0.805 <sup>c</sup>	1.265 <sup>b</sup>	1.658 <sup>a</sup>	1.463 <sup>ab</sup>	-	-	-
Cu, ppm	5.468	-	-	-	6.977	7.145	7.138

<sup>1)</sup> Control, commercial diet; T1, 0.3ppm organic selenium; T2, 1.0ppm organic selenium; T3, 1.0ppm inorganic selenium; T4, 125ppm organic copper; T5, 250ppm organic copper; T6, 250ppm inorganic copper.

<sup>2)</sup> Mean (n=8).

Table 1-9. Effects of dietary Se and Cu on sensory evaluation of eggs in laying hens<sup>1),2)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Flavor	7.69	7.91	7.81	7.72	7.69	7.56	8.00
Overall	7.56	7.75	7.69	8.19	8.06	7.64	7.81

<sup>1)</sup> Control, commercial diet; T1, 0.3ppm organic selenium; T2, 1.0ppm organic selenium; T3, 1.0ppm inorganic selenium; T4, 125ppm organic copper; T5, 250ppm organic copper; T6, 250ppm inorganic copper.

<sup>2)</sup> Mean (n=8).

2. Lycopene의 첨가 형태가 계란 내 lycopene 함량에 미치는 영향 (실험 2)

가. 재료 및 방법

1) 실험사료

사료 내 lycopene의 첨가가 계란 내 전이에 미치는 영향을 평가하기 위하여 합성 lycopene을 10 ppm, 20 ppm 첨가하거나 또는 토마토 paste 1.7%를 첨가하여 lycopene 함량이 5ppm이 되게 하여 대조구와 함께 전체 4개 처리구(4반복)로 구성하였다. 실험에 사용된 합성 lycopene은 Hoffman La Roche 제품이며, 토마토 paste는 미국 Heinz 제품을 사용하였다.

2) 실험사료

실험에 사용한 사료는 NRC 요구량(1994)의 기준을 충족하거나 상회하는 영양소 함량을 가진 대조구 사료를 기초 사료로 하여 합성 lycopene을 10 ppm, 20 ppm 첨가하거나 토마토 paste를 1.7% 첨가하여 배합하였으며, 5주간 시험 사료를 급여하였다(Table 2-1과 2-2).

Table 2-1. Experimental design

	Lycopene	Tomato paste
	----- % -----	
Control	-	-
Lycopene 10 ppm	0.01	-
Lycopene 20 ppm	0.02	-
Tomato paste <sup>1)</sup> 1.7%	-	1.7

<sup>1)</sup> Approximately 300 mg/kg lycopene in tomato paste supplying 5 ppm of lycopene.

Table 2-2. Formula and chemical composition of experimental diets

Ingredients (%)	Control	Lycopene		Tomato <sup>4)</sup> paste 1.7%
		10 ppm	20 ppm	
Corn	61.96	61.96	61.96	60.91
Dehulled lupin	3.00	3.00	3.00	2.95
Soybean meal (44%CP)	18.00	18.00	18.00	17.7
Dehulled soybean meal (48%CP)	0.30	0.30	0.30	0.29
Rapeseed meal	1.50	1.50	1.50	1.47
Corn gluten meal	2.00	2.00	2.00	1.97
Fish meal	0.70	0.70	0.70	0.69
Yellow grease	2.20	2.20	2.20	2.16
Limestone	9.10	9.10	9.10	8.95
Tricalciumphosphate	0.60	0.60	0.60	0.59
Salt	0.27	0.27	0.27	0.27
DL-Methionin	0.11	0.11	0.11	0.11
Choline-Cl	0.07	0.07	0.07	0.07
Vitamin premix <sup>1)</sup>	0.06	0.06	0.06	0.06
Mineral premix <sup>2)</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10
Phytase	0.03	0.03	0.03	0.03
Lycopene	-	0.01	0.02	-
Tomato paste <sup>3)</sup>	-	-	-	1.70
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated values				
Crude Protein		16.5		16.32
Crude Fat		4.76		4.72
Crude Fiber		3.46		3.43
Crude Ash		12.22		12.00
Ca		3.93		3.85
Available P		0.38		0.37
ME (Kcal/kg)		2,852		2,805

<sup>1)</sup> Vitamin mixture provided following nutrients per g of diet: Vit. A, 18,000IU; Vit. D<sub>3</sub>, 5,000IU; vitamin, 40mg; Vit. K<sub>3</sub>, 3.0mg; Vit. B<sub>1</sub>, 1.0mg; Vit. B<sub>2</sub>, 10mg; B<sub>6</sub>, 3mg; Vit. B<sub>12</sub>, 0.020mg; Niacin, 132.0mg; Biotin, 0.12mg; Folacin, 1.0mg; Pantothenic acid, 14.0mg.

<sup>2)</sup> Mineral mixture provided following nutrients per g of diet: Fe, 72mg; Mn, 90mg; Zn, 74mg; I, 1.8mg; Se, 0.36mg; Cu, 4.8mg.

<sup>3)</sup> Tomato paste suggested the following nutrients per kg by Heinz Co.(USA): GE, 0.67Kcal; Total carbohydrate, 16.7%(sugar 10%, fiber 6.7%); Protein, 3.3%; Na, 0.05%; free of fat, cholesterol, Ca and Fe.

<sup>4)</sup> Approximately 300 mg/kg lycopene in tomato paste supplying 5 ppm of lycopene.

### 3) 실험동물

38주령 Hy-Line Variety Brown 산란계 160수를 실험동물로 공시하여 각 처리구 별 40수, 반복당 10수씩을 임의 배치하였으며, 6주간 실험을 실시하였다.

### 4) 사양관리

실험 1과 동일하게 시행하였다.

### 5) 조사항목

가) 사료섭취량, 난 생산성 및 간중량

실험 1과 동일하게 시행하였다.

나) 난각 강도, 난각 두께, Haugh unit 및 난황색

실험 1과 동일하게 시행하였다.

다) 혈액 콜레스테롤 농도

실험 1과 동일하게 시행하였다.

라) 계란 보존성

실험 종료 5일전부터 생산된 계란을 전량 수집하여 종란 저장고에서 보존하였다. 7일째 및 15일째 보존 중인 계란의 Haugh unit를 조사하여 시간 경과에 따른 변화를 조사하였다.

마) 난황 및 간 내 lycopene 함량

실험 종료시에 처리구 당 15개씩의 계란을 채취하였고, 간은 처리구 당 10수씩 도살한 닭으로부터 샘플을 취하여 각각의 lycopene 함량을 분석하였다. 난황과 간 내 lycopene 분석은 Boileau 등(2000)의 방법을 응용하여 시료에서 lycopene을 추출하고, Wei 등 (2001)의 방법을 응용하여 high performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하여 분석하였다.

### 6) 통계분석

실험 1과 동일하게 결과를 통계처리 하였다.

## 나. 결과 및 고찰

### 1) 사료섭취량 및 난 생산성에 미치는 영향

산란계 사료 내에 합성 lycopene과 토마토 paste를 첨가하여 급여하였을 때 사료 섭취량, 난중 및 산란율의 변화에 대한 결과는 Table 2-3에 나타내었다. 사료섭취량에 있어서 실험 기간동안 처리구간에 통계적인 유의차는 없었다. 그러나 난중에 있어서는 대조구가 65.87 g이고, lycopene 첨가구와 토마토 paste 첨가구는 63.08~63.63 g으로 대조구에 비해 유의하게 낮았다( $P<0.05$ ). 산란율에 있어서는 토마토 paste 첨가구가 92.35%로 가장 높았고 합성 lycopene 20 ppm 첨가구는 대조구에 비해서 유의하게 낮았으며(88.85% vs. 85.23%;  $P<0.05$ ), 합성 lycopene 10 ppm 첨가구에서는 통계적인 유의차는 없었지만 낮은 것으로 나타났다.

Lycopene이 산란계의 생산성에 미치는 영향에 대한 선행 연구는 없으나  $\beta$ -carotene을 첨가하여 급여하면 난황의 carotene 함량은 높아지고 산란율, 사료 섭취량, 난중, 계란의 비중, 부화율 및 생체중에는 영향을 주지 않았다는 연구 결과가 발표된바 있고,  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene과 retinol을 단독으로 또는 혼합하여 사료에 첨가 급여하였을 때도 산란율, 난중 등에는 영향을 주지 않았다(Jiang 등, 1994). 그러나 Japanese quail을 대상으로 한 최근의 실험(Sahin 등, 2004)에서는 lycopene 100 ppm 또는 vitamin E (DL- $\alpha$ -tocopherol-acetate) 250 ppm을 단독으로 급여하거나 동일량을 혼합 급여하였을 때 산란율과 Haugh unit가 대조구에 비해 증가하였다.

본 연구 결과 난중이 대조구에 비해 lycopene 첨가구 및 토마토 paste 첨가구에서 모두 유의하게 낮은 것으로 나타나, 위의 선행 연구와는 다른 결과를 보여 주었다. 간의 상대적 중량에서는 처리간에 유의한 차이는 없었다.

### 2) 난질 및 난각질에 미치는 영향

산란계 사료 내에 합성 lycopene과 토마토 paste를 첨가하여 급여하였을 때 난질 및 난각질의 변화에 대한 결과는 Table 2-4과 2-5에 나타내었다. 난각강도와 난각두께는 실험 전 기간동안 모든 처리구 간에 유의한 차이를 나타내지 않았다. Haugh unit에서도 실험 전 기간 동안 모든 처리구간에 있어 통계적 유의차가 발견되지 않았다. 난황색은 합성 lycopene 첨가구가 대조구에 비해 1주차부터 유의하게( $P<0.05$ ) 높게 나타났고 토마토 paste 첨가구는 대조구와 비교하여 주별로 유의하게 높거나( $P<0.05$ ) 높은 경향이 나타났다. 합성 lycopene 첨가구간에도 20 ppm 첨가구가 10 ppm 첨가구에 비해 유의하게 높거나( $P<0.05$ ) 높은 경향이 나타났으며, 합성



lycopene 첨가구는 토마토 paste 첨가구보다 2주차부터는 유의하게 높았다( $P<0.05$ ).

Dotas 등(1999)은 순수 lycopene은 아니지만 토마토 가공 부산물인 dried tomato pulp를 12% 수준으로 첨가하여 산란계에 급여하였을 때 carophyll 첨가 시 보다는 못하지만 유의하게 난황의 착색 효과가 있었다고 보고하였다. 본 시험 결과 합성 lycopene 10 ppm, 20 ppm 첨가 수준에서 시험 개시 1주후부터 난황의 착색 효과가 유의하게 나타났고, 첨가 수준이 많은 합성 lycopene 첨가구가 토마토 paste 첨가구보다 난황에 착색되는 현상이 보다 더 명확하게 나타나는 것으로 미루어 볼 때 난황의 착색도는 천연, 합성 여부와 관계없이 lycopene의 첨가 수준에 따라 높아지는 것으로 사료된다. 선행 연구에서는 4 ppm 이상에서 유의하게 착색효과가 나타났는데 (Kang 등, 2003), 본 실험에서 토마토 paste 첨가구(lycopene 5 ppm)의 결과는 대조구에 비해 일관된 유의차는 인정되지 않았다.

Table 2-3. Effects of dietary supplementation of lycopene and tomato paste on feed intake, egg performances and liver weight in laying hens<sup>1)</sup>

	Control	Lycopene		Tomato paste 1.7% <sup>1)</sup>
		10 ppm	20 ppm	
Feed intake, g/bird/d	118.90 ±1.83	116.66 ±2.89	116.81 ±1.08	120.13 ±0.98
Egg weight, g/day	65.87 ±0.05 <sup>a</sup>	63.33 ±0.27 <sup>b</sup>	63.63 ±0.36 <sup>b</sup>	63.08 ±0.24 <sup>b</sup>
Egg production rate, %	88.85 ±0.44 <sup>b</sup>	86.73 ±0.93 <sup>bc</sup>	85.23 ±0.94 <sup>c</sup>	92.35 ±0.76 <sup>a</sup>
Liver weight, g/100g BW	1.58 ±0.13	1.54 ±0.06	1.37 ±0.06	1.50 ±0.07

<sup>1)</sup> Approximately 300 mg/kg lycopene in tomato paste supplying 5 ppm of lycopene.

<sup>a-c</sup> Means ± SE within the same row with no common superscripts differ significantly( $P<0.05$ ).

Table 2-4. Effects of dietary supplementation of lycopene and tomato paste on eggshell strength, eggshell thickness, and Haugh unit in laying hens<sup>1,2)</sup>

	Control	Lycopene		Tomato paste 1.7% <sup>1)</sup>
		10 ppm	20 ppm	
Eggshell strength, kg/cm <sup>2</sup>	4.54 ±0.23	4.74 ±0.52	4.50 ±0.29	4.39 ±0.31
Eggshell thickness, mm×10 <sup>-2</sup>	35.60 ±1.07	35.90 ±1.03	34.97 ±1.04	35.35 ±0.98
Haugh unit <sup>3)</sup>	82.41 ±1.07	81.19 ±1.15	82.37 ±1.53	83.22 ±0.94

<sup>1)</sup> Approximately 300 mg/kg lycopene in tomato paste supplying 5 ppm of lycopene.

<sup>2)</sup> Means ± SE.

Table 2-5. Effects of dietary supplementation of lycopene and tomato paste on yolk color in laying hens<sup>1,2)</sup>

	Control	Lycopene		Tomato paste 1.7% <sup>1)</sup>
		10 ppm	20 ppm	
Yolk color		----- R.C.F. <sup>2)</sup> -----		
1 wk	6.76 ±0.09 <sup>c</sup>	8.62 ±0.54 <sup>ab</sup>	9.17 ±0.54 <sup>a</sup>	7.60 ±0.16 <sup>bc</sup>
2 wk	7.15 ±0.04 <sup>d</sup>	8.54 ±0.12 <sup>b</sup>	9.06 ±0.06 <sup>a</sup>	7.43 ±0.04 <sup>c</sup>
3 wk	7.73 ±0.09 <sup>c</sup>	8.90 ±0.27 <sup>b</sup>	10.19 ±0.15 <sup>a</sup>	8.13 ±0.13 <sup>c</sup>
4 wk	8.15 ±0.10 <sup>c</sup>	10.22 ±0.19 <sup>a</sup>	10.31 ±0.07 <sup>a</sup>	9.03 ±0.16 <sup>b</sup>
5 wk	7.56 ±0.20 <sup>b</sup>	9.44 ±0.30 <sup>a</sup>	10.03 ±0.16 <sup>a</sup>	8.08 ±0.23 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> Approximately 300 mg/kg lycopene in tomato paste supplying 5 ppm of lycopene.

<sup>2)</sup> Roche color fan.

<sup>a-c</sup> Means ± SE within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

3) 혈액 성분에 미치는 영향

산란계 사료 내에 합성 lycopene과 토마토 paste를 첨가하여 급여하였을 때 혈액 성분의 변화에 대한 결과는 Table 2-6에 나타내었다.

총지질, 중성지질, 총 콜레스테롤 및 HDL-C 농도는 처리간에 통계적인 유의차가 없었다. 사람을 대상으로 조사한 선행연구에서는 lycopene 함량과 지질 함량과는 관계가 없다는 보고(Rissanen 등, 2002)와 lycopene을 섭취케 하면 LDL-C과 중성지질이 감소하였다는 보고(Friedman 등, 2000)가 있다. Japanese quail을 공시한 연구에서는 lycopene 100 ppm 또는 vitamin E 250 ppm을 70일간 급여하여 혈장의 총 콜레스테롤 농도가 낮아졌음이 확인되었다(Sahin 등, 2004). 그러나 lycopene 10 ppm, 20 ppm 수준 및 토마토 paste 1.7% 수준으로 사료에 첨가하여 35일간 급여한 본 실험에서는 혈액 내 지질 함량에 변화를 주지 못하는 것으로 나타났는데, lycopene의 첨가량과 급여기간에 따른 지질 대사에 미치는 영향에 대하여 추후 조사가 필요함을 시사하고 있다.

Table 2-6. Effects of dietary supplementation of lycopene and tomato paste on various blood profiles in laying hens<sup>1),2),3)</sup>

	Control	Lycopene		Tomato paste 1.7% <sup>2)</sup>
		10 ppm	20 ppm	
-----mg/dl-----				
Total lipid	975.1 ±76.5	1291.4 ±142.6	974.5 ±96.5	1218.6 ±97.2
Triglyceride	617.3 ±84.9	862.1 ±131.0	636.9 ±87.7	936.3 ±124.1
Total-C	85.8 ±4.3	99.1 ±8.3	82.3 ±4.2	96.9 ±9.5
HDL-C	5.6 ±0.7	5.0 ±0.9	6.6 ±0.8	7.1 ±1.3

<sup>1)</sup> Abbreviation : Total-C, total cholesterol; HDL-C, HDL-cholesterol.

<sup>2)</sup> Approximately 300 mg/kg lycopene in tomato paste supplying 5 ppm of lycopene.

<sup>3)</sup> Means ± SE.

#### 4) 계란의 보존성에 미치는 영향

산란계 사료 내에 합성 lycopene과 토마토 paste를 첨가하여 급여하였을 때 계란의 보존성에 미치는 영향에 대하여 그 결과를 Table 2-7에 나타내었다.

Haugh unit는 계란의 신선도를 나타내는 척도로 저장 기간이 길어질수록 그 수치가 떨어지는 것이 일반적인 현상이다. 본 연구 결과 1주후와 2주 후의 Haugh unit는 모든 처리구에서 유의차가 없었으며, 저장 기간이 경과하면서 전체적으로 모든 처리구에서 Haugh unit가 떨어지긴 하였으나 1주차와 2주차의 차이에 있어서도 대조구를 비롯한 모든 처리구에서 통계적인 유의차가 없는 것으로 나타났다.

Lycopene 및 토마토 paste의 항산화 능력을 고려해 볼 때 계란의 보존성 개선 효과가 기대되었으나 본 실험의 보관 조건하에서는 lycopene 또는 토마토 paste의 첨가가 Haugh unit에 대해 미치는 영향은 크지 않았다.

#### 5) 난황 및 간 내 lycopene 함량

산란계 사료 내에 합성 lycopene과 토마토 paste의 첨가 급여가 난황 및 간 내 lycopene 함량에 미치는 영향에 대하여 Table 2-8에 나타내었다. 합성 lycopene 10 ppm과 20 ppm 첨가구가 대조구와 토마토 paste 첨가구에 비해 계란 내 함량이 유의하게 높게 나타났다( $P<0.05$ ). Lycopene 20 ppm 첨가구에서는  $0.881 \mu\text{g/g}$ , 10 ppm 첨가구에서는  $0.795 \mu\text{g/g}$ 의 lycopene이 나타났는데 합성 lycopene 첨가구간에는 유의차가 인정되지 않았다. 토마토 paste 첨가구에서는  $0.425 \mu\text{g/g}$ 으로, 합성 lycopene 첨가구 보다는 유의하게 낮았으나( $P<0.05$ ), 대조구의  $0.174 \mu\text{g/g}$  보다는 유의하게 높게 나타났다( $P<0.05$ ). 대조구의 간에서는 lycopene이 검출되지 않았으나, 합성 lycopene 10 ppm과 20 ppm 첨가구에서 간의 lycopene 함량이 토마토 paste 첨가구에 비해 유의하게 높았으며( $P<0.05$ ), lycopene 20 ppm 첨가구가  $6.458 \mu\text{g/g}$ 으로 가장 높게 나타났다. 토마토 paste 1.7% 첨가구는  $0.702 \mu\text{g/g}$ 으로 합성 lycopene 첨가구 보다는 유의하게 낮았다( $P<0.05$ ).

Lycopene은 carotenoid의 일종으로 동물의 생체에서는 합성되지 않으나 식이에 따라 혈액뿐 아니라 여러 조직에 함유되어 있다(Rao와 Agarwal, 1999). Ollilainen 등(1989)은 소량의 lycopene이 난황에 있다고 하였는데 본 실험의 경우 대조구 난황에서  $0.174 \mu\text{g/g}$ 의 lycopene이 나타났다. Kang 등(2003)의 최근 연구에서 산란계에 4, 8, 12 ppm의 lycopene을 첨가하여 16일간 급여하였을 때 난황 내의 lycopene 함량이 대조구에 비해 8일째부터 유의하게 높아졌고 12 ppm을 16일간 급여했을 경우

평균 난황 1 g당 1.88  $\mu\text{g/g}$ 의 lycopene이 분석되었다고 보고하였는데, 본 실험의 결과보다는 높은 결과를 보여주었다.

본 실험에서 난황의 lycopene 농도는 간에서의 lycopene의 농도와 비례하는 경향을 보여 주었으며 사료 중의 lycopene이 난황으로 이전될 수 있음이 확인되었다. Lycopene은 지용성이며 난황에는 지질 성분이 육류에 비해 상대적으로 많은 점을 고려하면 향후 항산화 효과가 우수한 lycopene이 함유되어 있는 기능성 계란을 생산할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 2-7. Effects of dietary supplementation of lycopene and tomato paste on egg Haugh unit during storage at room temperature<sup>1),2)</sup>

	Control	Lycopene		Tomato paste 1.7% <sup>1)</sup>
		10 ppm	20 ppm	
7 day	81.33 $\pm$ 0.93	81.61 $\pm$ 0.63	80.90 $\pm$ 0.73	80.99 $\pm$ 0.53
14 day	62.97 $\pm$ 2.38	59.79 $\pm$ 1.80	59.31 $\pm$ 2.82	63.46 $\pm$ 4.23
Differences	18.36 $\pm$ 2.77	21.82 $\pm$ 2.04	21.58 $\pm$ 2.16	17.53 $\pm$ 4.02

<sup>1)</sup> Approximately 300 mg/kg lycopene in tomato paste supplying 5 ppm of lycopene.

<sup>2)</sup> Means  $\pm$  SE.

Table 2-8. Effects of dietary supplementation of lycopene and tomato paste on lycopene concentration of egg yolk and liver in laying hens<sup>1),2)</sup>

	Control	lycopene		Tomato paste 1.7% <sup>2)</sup>
		10 ppm	20 ppm	
Egg yolk	0.174 $\pm$ 0.016 <sup>c</sup>	0.795 $\pm$ 0.075 <sup>a</sup>	0.881 $\pm$ 0.060 <sup>a</sup>	0.425 $\pm$ 0.049 <sup>b</sup>
Liver	ND	3.638 $\pm$ 0.354 <sup>y</sup>	6.458 $\pm$ 0.837 <sup>x</sup>	0.702 $\pm$ 0.085 <sup>z</sup>

<sup>1)</sup> Abbreviation : ND, not detected.

<sup>2)</sup> Approximately 300 mg/kg lycopene in tomato paste supplying 5 ppm of lycopene.

<sup>a-c</sup> Means  $\pm$  SE within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

3. 타우린 및 카르니틴의 첨가 수준 및 첨가 형태가 계란 내 타우린 및 카르니틴 함량에 미치는 영향 (실험 3)

가. 재료 및 방법

1) 실험 시료

시료로서 사용한 타우린은 (주)이지바이오에서 공급받았으며, 카르니틴은 (주)좋은나라 구입하여 첨가하였다.

2) 실험 사료

옥수수·대두박을 기초로 하여 대사에너지 2800kcal/kg와 16.1%의 조단백질 그리고 기타 영양소의 수준은 NRC 요구량(1994)에 맞도록 기초사료를 배합하여 대조구 사료로 사용하였다. 처리구 사료는 오징어간분 2.0% 첨가한 T1 처리구, 오징어간분 2.0%, 정제타우린을 0.02%를 첨가한 T2 처리구, 정제타우린 0.04% 첨가한 T3 처리구, 정제타우린 0.20% 첨가한 T4 처리구, 카르니틴 0.04%를 첨가한 T5 처리구, 카르니틴 0.10% 처리한 T6처리구, 카르니틴 0.20% 처리한 처리구로 실험을 실시하였다. (Table 3-1과 3-2)

Table 3-1. Experimental design

	Taurine byproduct	Synthetic taurine	Synthetic carnitine
		----- % -----	
Control	-	-	-
T1	2.0	-	-
T2	2.0	0.02	-
T3	-	0.04	-
T4	-	0.2	-
T5	-	-	0.04
T6	-	-	0.1
T7	-	-	0.2

Table 3-2. Formula and chemical composition of experimental diets<sup>1)</sup>

Ingredients (%)	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Corn	65.52	63.52	63.50	65.48	65.32	65.52	65.52	65.52
Lupin seed	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Soybean meal	13.96	13.96	13.96	13.96	13.96	13.96	13.96	13.96
Rapeseed meal	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Meat meal	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Limestone	9.51	9.51	9.51	9.51	9.51	9.51	9.51	9.51
Dicalcium phosphate	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Tallow	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Choline-chloride (50%)	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
DL-Methionine	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
Mineral mix <sup>2)</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin mix <sup>3)</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Phytase	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
Taurine byproduct	-	2.00	2.00	-	-	-	-	-
Synthetic taurine	-	-	0.02	0.04	0.20	-	-	-
L-carnitine	-	-	-	-	-	0.04	0.10	0.10
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	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 <sub>n</sub> , kcal/kg	2,800

<sup>1)</sup> T1, 2% squid liver powder; T2, 2% squid liver powder + 0.02% taurine; T3, 0.04% taurine; T4, 0.2% taurine; T5, 0.04% synthetic carnitine; T6, 0.1% synthetic carnitine; T7, 0.2% synthetic carnitine.

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

<sup>3)</sup> 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, 2.4mg; vitamin B1, 1.2mg; vitamin B2, 4.8mg; vitamin B6, 2.4mg; vitamin B12, 0.02mg; niacin, 15mg; pantothenic acid, 10mg; folic acid, 0.3mg.

### 3) 실험 동물

50주령의 Hy-Line Brown Variety 산란계 암컷을 이용하여 동일한 면적의 산란계 2수용 케이지에 모두 8개 처리구 3반복으로, 총 240수를 선발하여 2주간 일반 시판 사료로 예비사육 하였으며, pen당 산란율이 유사하도록 재배치 한 후 실험에 이용하였으며, 타우린, 카르니틴 첨가 실험은 6주간 실시하였다.

### 4) 사양 관리

실험 1과 동일하게 시행하였다.

### 5) 조사 항목

#### 가) 사료섭취량과 난 생산성

실험 1과 동일하게 시행하였다.

#### 나) 난질 및 난각질

실험 1과 동일하게 시행하였다.

#### 다) 혈액 콜레스테롤 농도 및 간 기능 관련 효소의 활성

8주간의 실험 종료 후, 처리구 별로 8수씩 선발한 공시계의 익하정맥에서 1회용 주사기로 혈액을 채취한 후 원심분리(1500rpm × 15min)하여 혈청을 분리하였으며, 진단용 콜레스테롤 kit (콜레스테롤 E kit, HDL-콜레스테롤 kit, 영동제약)를 사용하여 비색방법으로 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 농도를 측정하였다.

혈청 내의 glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) 및 glutamic-pyruvic transaminase (GPT) 함량은 GOT-GPT kit (GOT-GPT kit, 영동제약)를 사용하여 비색방법으로 측정하였다.

#### 라) 계란 내 타우린 함량

실험 6주째 얻은 계란을 할란하여 난황만 취한 후 homogenizer로 난황을 균질하게 갈아 시료로 이용하였으며, Test tube에 난황 0.02g을 Performic acid 15ml와 혼합하고 0℃에서 24시간 둔다. 24시간 경과 후 48% HBr 0.75ml를 가하고 가스가 발생 후 완전히 빠지면 cap를 막고 0℃에서 1시간 보관한다. test tube를 상온까지 방치하고 50℃ Water bath에서 감압농축 한다. 증류수를 넣어 감압농축을 재실시한다. 감압농축 된 시료에 6N HCl를 5ml씩 3번 나누어 15ml를 test tube에 넣는다. 약 1분간 질소가스로 충전하고 cap으로 막고 110℃ dry oven에서 24시간이상 방치한다. Test tube의 시료를 55℃ Water bath에서 감압농축 실시하고 증류수를 넣어서 감압



농축을 재실시 한다. 2.20 Dilution buffer로 25ml에 Volumetric flask에 적용하고 0.45 $\mu$ l Membrane filter로 여과 후 회석하여 분석하였다.

#### 마) 계란 내 카르니틴 함량

실험 6주째 얻은 계란을 할란하여 난황만 취한 후 homogenizer로 난황을 균질하게 갈아 시료로 이용하였으며, 계란 50mg 증류수 1.5ml에 혼합하여 균질화 후 0.1ml을 50 mmol/L KOH 0.9ml에 혼합후 실온에서 24시간 방치하였다. Bradford의 방법을 이용해서 NCP(Non-collagen protein)은 Bio-Rad protein assay를 이용해서 측정 NEC(Non-esterified carnitine), ASAC (acid-soluble acylcarnitine), AIAC (acid-insoluble acylcarnitine)은 Cederblad와 Lindstedt의 radio enzymatic 절차에 따라서 측정하였다. 이 과정에서 AIAC는 perchloric acid에 침전되고 ASAC와 NEC는 상층에서 존재하며 상층의 일부는 NEC를 측정하기 위해서 분석되었고 일부는 total acid-soluble carnitine을 분석하기 위해서 0.5N KOH로 가수분해 하였다. (ASAC +NEC), ASAC는 NEC와 total acid-soluble carnitine의 차이로 계산되었다. AIAC을 함유하고 있는 pellets을 말린 후 세척하고 0.5 N KOH를 첨가 후 60 $^{\circ}$ C의 Water bath에서 60초간 가수분해 시켰다. 각각의 carnitine은 carnitine acetyl transferase (Sigma, UAS)를 이용해 [1- $^{14}$ C] acetyl CoA 에서 [ $^{14}$ C] acetate로 에스테르화시켰다(Amersham, UK). 샘플의 Radioactivity는 Beckman LS3801 liquid scintillation counter(Beckman Instruments, Palo Alto, USA)를 이용해 측정하였다.

#### 바) 계란 내 콜레스테롤 함량

실험 2, 4 및 6주차 종료 시에 각 처리구에서 유사한 체중을 가진 개체에서 간과 혈액을 채취하여, 간 내 TOTAL-C, 중성지방, 인지질(phospholipid)을 측정하였으며, 혈청 내 cholesterol ester, 중성지방, 유리 콜레스테롤(free cholesterol), 인지질 농도를 측정하였다. 이때 간은 생리 식염수로 평균 다음 표면의 습기를 제거하였으며, 혈액은 채취한 후 원심분리(1,500rpm  $\times$  15min)하여 혈청을 얻었다. 이렇게 얻어진 간과 혈청은 분석 전까지 냉동(-20 $^{\circ}$ C) 보관하였다. Folch 등(1957)의 방법을 응용하여 총지질을 추출하였으며, An 등(1995)의 방법을 응용하여 IATRO SCAN(MK-6 TLC/FID analyzer, Iatron Laboratories, Inc., Tokyo, Japan)으로 간 및 혈청 내 각 지질분획의 함량을 분석하였다.

##### (1) 총지질의 추출

간 및 혈청 내 지질의 추출은 Folch 등(1957)의 방법에 기초하여 수행하였다. Folch 용액(chloroform : methanol = 2:1, v/v) 10ml에 혈청 및 간(간 1g을 취하여 탈이온수로 10배 희석) 0.5ml과 내부표준물질(0.1% cholesterol acetate in Folch

solution) 1ml을 첨가하였다. 실온에서 5분간 균질화한 후 여과지(Whatman No.541)를 이용해 여과하였다. 단백질을 제거를 위해 탈이온수 1ml을 첨가하여 혼합한 후 원심분리기(HA-1000-3, Hanil industry, Korea)에서 원심분리(2,500rpm×10min)한 후 aspirator를 이용하여 상층부를 흡입제거하고, 하층 기저부를 감압건조기를 이용하여 완전 건조시켰다. 방냉 후 Folch solution 1ml을 첨가하여 재용해한 후 이를 추출액으로 사용하였다.

#### (2) 지질분획의 분리

추출액을 microdispenser를 이용하여 silica gel chromarod(CHROMAROD-SIII, Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc., Japan)에 1 $\mu$ l을 spot 하고 제 1 전개용액(hexane : diethylether : formic acid = 60ml : 10ml : 0.1ml)이 들어있는 전개조 내에서 9cm의 높이까지 1차 전개시켰고, 60 $^{\circ}$ C 드라이 오븐에서 2분간 건조시켰다. 건조 후 제 2 전개용액(benzene : hexane = 40ml : 40ml)이 들어있는 전개조 내에서 10cm 높이까지 2차 전개시킨 후 60 $^{\circ}$ C 건조기에서 다시 2분간 건조시켰다.

#### (3) IATRO SCAN을 이용한 지질분획의 분석

1, 2차 전개를 통해 분리된 각 지질분획은 IATRO SCAN을 이용하여 분석하였다. IATRO SCAN의 분석 조건은 Table 3-3에 나타낸 바와 같다.

#### (4) 각 지질분획의 정량

IATRO SCAN의 FID는 검출하는 물질에 따라 감도차가 발생하기 때문에 정량분석을 실행하기 위해 측정된 면적비 대 성분량의 상대적 검량선을 작성하였다. 각 실험 성분의 무게를 정확히 측정 후 혼합하고 이를 Folch 용액(chloroform : methanol = 2:1, v/v) 1ml로 용해시켰다. 사용된 표준혼합시료용액의 성분 농도는 Table 3-4에 나타내었다. 표준혼합시료용액을 위의 방법과 동일하게 수행하여 chromatogram을 얻었다. 실험성분과 내부표준물질의 peak 면적비( $A_x/A_s$ )를 통해 실험성분과 내부표준물질의 중량비( $W_x/W_s$ )를 구하였으며 아래의 방정식에 따라 간 및 혈청의 각 지질분획의 함량을 계산하였다.

$$\text{간 내 함량(mg/g)} = (W_x/W_s) \times \text{내부표준물질(mg)} / \text{시료(mg)} \times 10$$

$$\text{혈청 내 함량(mg/dl)} = (W_x/W_s) \times \text{내부표준물질(mg)} / \text{시료(mg)} \times 100$$

Table 3-3. Analytical conditions of IATRO SCAN

Operation condition	
Stationary phase	CHROMAROD-SIII
Mobile phase	10ml
1st. hexane : diethylether : formic acid	60ml : 10ml: 0.1ml
2nd. benzene : hexane	40ml : 40ml
Hydrogen flow	160ml/min
Air flow	2000ml/min
Scanning speed	30sec/scan

Table 3-4. The contents of each component in standard solution<sup>1)</sup>

	Cho.E	Cho.A	TP	Cho	PCD
	mg/ml				
No. 1	12.00	1.0	7.50	2.00	12.50
No. 2	6.00	1.0	3.75	1.00	6.25
No. 3	3.00	1.0	1.88	0.50	3.13
No. 4	1.50	1.0	0.94	0.25	1.57
No. 5	0.75	1.0	0.47	0.13	0.79

<sup>1)</sup> Cho.E: cholesterol palmitate; Cho.A: cholesterol acetate; TP: tripalmitin; Cho: cholesterol; PCD: L-3-phosphatidylcholine dipalmitate.

사) 생산된 계란의 관능검사

시료를 1±0.2 cm의 일정한 두께로 정형하여 150℃로 예열된 전기그릴(HOBART, CG20-1, USA)위에 놓고 중심온도가 45℃에 이르렀을 때 뒤집어 가열하여 최종 중심온도가 72℃에 도달했을 때 꺼내어 일정한 크기로 썰어서 관능평가 시료로 이용하였으며, 관능평가의 경험이 있는 6명의 관능평가 요원을 구성하여 가열 조리된 시료에 대하여 연도, 맛, 풍미, 다즙성을 9 point hedonic scale에 의해 조사하였다.

6) 통계 분석

실험 1과 동일하게 결과를 통계처리 하였다.

## 나. 결과 및 고찰

### 1) 사료섭취량 및 난 생산성에 미치는 영향

산란계 사료 내 타우린 함유 원료, 합성 타우린 및 합성 카니틴의 첨가 급여가 사료섭취량 및 난 생산성에 미치는 영향을 Table 3-5에 명시하였다. 사료섭취량에서는 처리간에 큰 차이가 없었으나, 산란율은 대조구에 비해 유의하게 개선되거나 개선되는 경향을 나타내었다. 대조적으로 난중은 대조구에 비해 타우린 함유 원료나 합성 타우린을 급여한 처리구에서 감소하는 경향이 관찰되었다.

Yamazaki와 Takemasa (1998)은 정제 타우린을 산란계에게 급여했을 때 산란율에는 영향이 없었으나 난중이 유의하게 감소하였다고 하였고, 김 등(2002)은 타우린 공급 후에 난 생산성이 저하되었다고 보고하였다. 산란계 사료 내 카니틴의 첨가는 난 생산성에 아무런 영향도 미치지 않는 것으로 알려져 있다(Celik 등, 2004).

### 2) 난질 및 난각질에 미치는 영향

산란계 사료 내 타우린 함유 원료, 합성 타우린 및 합성 카니틴의 첨가 급여가 난질 및 난각질에 미치는 영향을 Table 3-6에 명시하였다. 난각강도, 난각두께, Haugh unit 및 난황색 모두 처리간에 큰 차이를 보이지 않았다.

김 등(2002) 및 Yamazaki와 Takemasa (1998)의 연구에서는 합성 타우린의 급여가 난질 및 난각질에 크게 영향을 미치지 않았다고 보고함으로써 본 실험과 일치하는 결과를 시사하였다. 카니틴의 급여 후에는 난각질과 난황색에서는 차이가 없었으나 난백 품질이 개선되는 효과가 있었으며(Rabie 등, 1997), 특히 고온사육의 조건에서는 난백 품질이 향상되었다(Celik 등, 2004).

Table 3-5. Effects of dietary taurine byproduct, synthetic taurine, and synthetic carnitine on feed intake and laying performances in laying hens<sup>1),2)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Feed intake, g/day/bird	136.51 ±5.56	149.06 ±5.62	150.19 ±6.23	146.78 ±1.19	147.71 ±0.31	147.11 ±2.47	140.54 ±2.78	144.60 ±4.19
Egg production rate, %	71.26 ±0.77 <sup>c</sup>	81.99 ±0.52 <sup>b</sup>	71.36 ±0.45 <sup>c</sup>	84.39 ±0.56 <sup>a</sup>	79.26 ±0.69 <sup>b</sup>	73.43 ±0.83 <sup>bc</sup>	81.38 ±0.37 <sup>b</sup>	76.27 ±0.90 <sup>b</sup>
Egg weight, g/egg	66.96 ±0.33 <sup>a</sup>	65.81 ±0.29 <sup>abc</sup>	66.84 ±0.45 <sup>a</sup>	65.14 ±0.30 <sup>bc</sup>	64.99 ±0.39 <sup>c</sup>	66.44 ±0.45 <sup>a</sup>	66.14 ±0.37 <sup>ab</sup>	66.61 ±0.26 <sup>a</sup>
Egg mass, g/hen/day	47.88 ±0.69 <sup>b</sup>	53.94 ±0.42 <sup>a</sup>	47.68 ±0.44 <sup>b</sup>	54.97 ±0.28 <sup>a</sup>	51.51 ±0.47 <sup>ab</sup>	48.79 ±0.45 <sup>b</sup>	53.84 ±0.72 <sup>a</sup>	50.81 ±0.75 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup> T1, 2% squid liver powder; T2, 2% squid liver powder + 0.02% taurine; T3, 0.04% taurine; T4, 0.2% taurine; T5, 0.04% synthetic carnitine; T6, 0.1% synthetic carnitine; T7, 0.2% synthetic carnitine.

<sup>a-c</sup> Means ± SE. within a row with no common letter are significantly different (P<0.05).

Table 3-6. Effects of dietary taurine byproduct, synthetic taurine, and synthetic carnitine on egg qualities in laying hens<sup>1),2)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Eggshell strength, kg/cm <sup>2</sup>	3.13 ±0.18	3.00 ±0.24	3.48 ±0.03	2.95 ±0.18	3.20 ±0.30	3.05 ±0.26	3.08 ±0.23	3.10 ±0.27
Eggshell thickness, 0.01mm	35.48 ±1.24	35.30 ±1.37	37.30 ±0.17	35.30 ±1.21	35.55 ±1.21	35.38 ±1.45	35.38 ±1.53	35.90 ±1.27
Haugh unit	84.53 ±2.23	83.38 ±1.30	79.75 ±1.60	83.15 ±2.15	81.28 ±3.18	80.13 ±2.86	82.45 ±2.09	83.45 ±3.55
Yolk color, R.C.F <sup>3)</sup>	7.50 ±0.14	7.70 ±0.07	7.80 ±0.07	7.75 ±0.09	7.65 ±0.17	7.40 ±0.11	7.75 ±0.06	7.73 ±0.10

<sup>1)</sup> T1, 2% squid liver powder; T2, 2% squid liver powder + 0.02% taurine; T3, 0.04% taurine; T4, 0.2% taurine; T5, 0.04% synthetic carnitine; T6, 0.1% synthetic carnitine; T7, 0.2% synthetic carnitine.

<sup>2)</sup> Means ± SE (n=8)

<sup>3)</sup> Roche color fan.

### 3) 혈액 성분에 미치는 영향

산란계 사료 내 타우린 함유 원료, 합성 타우린 및 합성 카니틴의 첨가 급여가 혈액 성분에 미치는 영향을 Table 3-7에 명시하였다. 혈액 내 총 콜레스테롤, HDL-C 농도 및 HDL-C/TOTAL-C 비율에서 처리간에 큰 차이를 보이지 않았다.

박강희(2002)는 산란계에 타우린을 급여한 연구에서 혈청 중성지질 및 HDL-C 농도에서는 차이가 없었으나 총 콜레스테롤 함량이 유의하게 증가하는 결과를 관찰함으로써 본 실험과는 일부 상반된 결과를 제시하였다. 카니틴 첨가가 산란계의 혈중 지질 분획에 미치는 영향에 대해서는 조사한 자료가 없어서 본 실험의 결과를 비교할 수 없었다.

### 4) 혈청 및 계란 내 타우린 함량에 미치는 영향

산란계 사료 내 타우린 함유 원료 및 합성 타우린의 단일급여 또는 혼합급여가 혈청 및 계란 내 타우린 함량에 미치는 영향을 Table 3-8에 명시하였다.

대조구에 비해 타우린 함유 원료 및 합성 타우린을 첨가 급여한 모든 처리구에서 혈청 내 타우린 농도가 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 그러나 난황 내의 타우린 함량은 타우린 함유 원료 급여구에서는 대조구와 큰 차이가 없었으며, 합성 타우린을 0.04% 이상 첨가한 처리구(T3 및 T4)에서만 유의하게 증가하는 결과가 관찰되었다.

타우린의 전이 수준을 조사한 선행연구가 거의 없으나, 타우린을 급여하지 않았던 대조구의 난황 내 타우린 함량이 비교적 높은 수준이어서 타우린 함유 원료의 급여 효과가 나타나지 않았던 것으로 사료되었다. 또한 T4 처리구의 사료 내 타우린 첨가량은 T3 처리구의 5배이었으나 난황 내 타우린 증가가 그리 크지 않았던 점을 고려하면 타우린 함유 계란 생산을 위한 적절한 첨가 수준은 사료 내 0.04% 정도일 것으로 판단되었다.

Table 3-7. Effects of dietary taurine byproduct, synthetic taurine, and synthetic carnitine on various blood profiles in laying hens<sup>1),2),3)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
TOTAL-C, mg/100ml	233.82 ±5.38	229.70 ±6.13	228.18 ±10.43	230.90 ±7.79	223.10 ±6.99	233.44 ±4.89	231.93 ±10.25	238.30 ±4.39
HDL-C, mg/100ml	82.14 ±3.64	84.06 ±4.68	86.79 ±1.86	86.53 ±2.28	85.00 ±4.35	87.10 ±1.42	85.37 ±3.17	85.93 ±3.65
HDL-C/TOTAL-C	0.37 ±0.02	0.38 ±0.04	0.37 ±0.02	0.38 ±0.01	0.39 ±0.03	0.38 ±0.01	0.35 ±0.02	0.36 ±0.01
GOT, U/L	167.53 ±4.59	169.67 ±6.36	170.26 ±3.97	182.43 ±5.06	168.84 ±3.54	161.41 ±5.36	151.58 ±4.03	160.54 ±12.17
GPT, U/L	4.48 ±0.64	4.60 ±1.10	3.97 ±1.16	5.06 ±4.67	3.54 ±0.58	5.35 ±0.99	4.13 ±1.54	4.78 ±0.69

<sup>1)</sup> Abbreviation : TOTAL-C, total cholesterol; HDL-C, high density-cholesterol; GOT, glutamic-oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic-pyruvic transaminase.

<sup>2)</sup> T1, 2% squid liver powder; T2, 2% squid liver powder + 0.02% taurine; T3, 0.04% taurine; T4, 0.2% taurine; T5, 0.04% synthetic carnitine; T6, 0.1% synthetic carnitine; T7, 0.2% synthetic carnitine.

<sup>3)</sup> Means ± SE (n=8).

Table 3-8. Effect of dietary taurine byproduct and synthetic taurine on the contents of taurine of the serum and egg yolk in laying hens<sup>1),2)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4
			----- ppm -----		
Serum	10.01 ±0.38 <sup>d</sup>	17.78 ±1.56 <sup>c</sup>	24.99 ±2.25 <sup>ab</sup>	20.36 ±3.17 <sup>b</sup>	30.34 ±0.94 <sup>a</sup>
Egg yolk	45.89 ±2.85 <sup>c</sup>	49.81 ±1.82 <sup>c</sup>	46.46 ±1.92 <sup>c</sup>	60.67 ±3.48 <sup>b</sup>	67.60 ±1.62 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> T1, 2% squid liver powder; T2, 2% squid liver powder + 0.02% taurine; T3, 0.04% taurine; T4, 0.2% taurine.

<sup>a-d</sup> Means± SE with different superscripts differ significantly (P<0.05).

5) 계란 내 카니틴 함량에 미치는 영향

산란계 사료 내 합성 카니틴의 급여가 계란 내 카니틴 함량에 미치는 영향을 Table 3-9에 명시하였다.

대조구에 비해 합성 카니틴을 첨가 급여한 모든 처리구에서 난황 내 카니틴 함량이 유의하게 증가하였으며, 급여 수준에 비례하여 난황 내 함량 역시 선형적으로 증가한 것으로 나타났다. 카니틴을 산란계에 급여했을 때 난황 내 카니틴이 증가한다는 결과는 Leibetseder (1995)의 연구에서도 유사하게 관찰되었다. 타우린과는 대조적으로 카니틴은 급여 수준과 비례하여 선형적으로 증가하기 때문에 경제성을 고려한 이용이 필요할 것이다.

Table 3-9. Effect of dietary carnitine on the contents of carnitine of egg yolk in laying hens<sup>1)</sup>

	Control	T5	T6	T7
	----- mg/100g -----			
Egg yolk	0.39 ±0.01 <sup>d</sup>	0.66 ±0.03 <sup>c</sup>	0.96 ±0.05 <sup>b</sup>	1.51 ±0.14 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> T5, 0.04% synthetic carnitine; T6, 0.1% synthetic carnitine; T7, 0.2% synthetic carnitine.

<sup>a-d</sup> Means ± SE with different superscripts differ significantly (P<0.05).



#### 6) 계란 내 각 지질분획 함량에 미치는 영향

산란계 사료 내 타우린 함유 원료, 합성 타우린 및 합성 카니틴의 첨가 급여가 난황 내 각 지질 함량에 미치는 영향을 Table 3-10에 나타내었다.

난황 총 콜레스테롤 함량에서는 처리간에 큰 차이가 없었으나 중성지질 함량은 대조구에 비해 모든 처리구에서 유의하게 감소하거나 감소하는 경향을 보여 주었다. 인지질 함량에서는 처리간에 큰 변화는 없었다. 김 등(2002)은 정제 타우린을 산란계에 급여했을 때 난황 내 콜레스테롤 함량에는 변화가 없었으나 난황 중성지질 함량이 14-19% 정도 증가하였다고 본 실험과 상반된 결과를 보고하였다. 정제 카니틴의 급여가 난황 콜레스테롤을 감소시켰다는 Leibetseder (1995)의 보고 역시 본 실험과는 대조적인 결과라 할 수 있겠다. 타우린 및 카니틴을 산란계 사료에 첨가 급여했던 연구가 몇 편에 불과하기 때문에 추후 다양한 연구를 통해 계란 내 전이 효율 및 총 콜레스테롤 함량에 미치는 영향을 명확히 규명할 필요가 있겠다.

#### 7) 관능적 특성에 미치는 영향

산란계 사료 내 타우린 함유 원료, 합성 타우린 및 합성 카니틴의 첨가 급여가 계란의 관능적 특성에 미치는 영향을 Table 3-11에 나타내었다. 계란의 풍미 및 전체적 선호도에서 처리간에 큰 차이는 없었으며, 이는 타우린 함유 원료, 합성 타우린 및 합성 카니틴의 급여가 생산된 계란의 관능적 특성에 부정적인 영향을 미치지 않음을 의미하는 것으로 생각된다.

Table 3-10. Effects of dietary taurine byproduct, synthetic taurine, and synthetic carnitine on the contents of various lipid fractions of egg yolks in laying hens<sup>1)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Cholesterol, mg/g	13.93 ±0.24	13.62 ±1.17	12.62 ±0.82	12.04 ±0.71	13.61 ±0.41	12.74 ±0.53	12.20 ±0.46	13.35 ±0.74
Triacylglycerol, mg/g	201.66 ±1.09 <sup>a</sup>	182.10 ±3.13 <sup>c</sup>	183.53 ±2.93 <sup>bc</sup>	184.54 ±1.31 <sup>bc</sup>	194.97 ±2.16 <sup>ab</sup>	190.78 ±4.14 <sup>abc</sup>	192.00 ±3.75 <sup>abc</sup>	184.99 ±5.79 <sup>bc</sup>
Phospholipid, mg/g	73.00 ±2.37	71.03 ±0.56	81.87 ±7.41	76.27 ±5.28	81.55 ±6.62	78.43 ±2.86	78.16 ±6.57	74.24 ±4.46

<sup>1)</sup> T1, 2% squid liver powder; T2, 2% squid liver powder + 0.02% taurine; T3, 0.04% taurine; T4, 0.2% taurine; T5, 0.04% synthetic carnitine; T6, 0.1% synthetic carnitine; T7, 0.2% synthetic carnitine.

<sup>a-c</sup> Means ± SE. within a row with no common letter are significantly different (P<0.05).

Table 3-11. Effects of dietary taurine byproduct, synthetic taurine, and synthetic carnitine on sensory evaluation of egg in laying hens<sup>1),2)</sup>

	Control	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Flavor	7.73	7.54	7.37	7.25	8.02	7.78	7.89	7.84
Overall	7.87	7.76	7.78	7.87	7.64	7.98	8.01	7.75

<sup>1)</sup> T1, 2% squid liver powder; T2, 2% squid liver powder + 0.02% taurine; T3, 0.04% taurine; T4, 0.2% taurine; T5, 0.04% synthetic carnitine; T6, 0.1% synthetic carnitine; T7, 0.2% synthetic carnitine.

<sup>2)</sup> Mean (n=8).

#### 4. 다양한 수준의 엽산 첨가가 계란 내 엽산 함량에 미치는 영향 (실험 4)

##### 가. 재료 및 방법

###### 1) 실험 시료

시료로서 사용한 엽산은 DSM에서 구입하여 첨가하였다.

###### 2) 실험 사료

옥수수·대두박을 기초로 하여 대사에너지 2800kcal/kg와 16.1%의 조단백질 그리고 기타 영양소의 수준은 NRC 요구량(1994)에 맞도록 기초사료를 배합하여 대조구 사료로 사용하였다. 처리구 사료는 엽산 2.0ppm 첨가한 T1 처리구, 엽산 10ppm를 첨가한 T2 처리구, 엽산 20ppm을 첨가한 T3 처리구로 실험을 실시하였다. (Table 4-1 과 4-2)

###### 3) 실험 동물

52주령의 Hy-Line Brown Variety 산란계 암컷을 이용하여 동일한 면적의 산란계 2수용 케이지에 모두 11개 처리구 3반복으로, 총 330수를 선발하여 2주간 일반 시판 사료로 예비사육 하였으며, pen당 산란율이 유사하도록 재배치 한 후 실험에 이용하였으며, 사양 실험은 6주간 실시하였다.

###### 4) 사양 관리

실험 1과 동일하게 시행하였다.

###### 5) 조사 항목

###### 가) 사료섭취량과 난 생산성

실험 1과 동일하게 시행하였다.

###### 나) 난질 및 난각질

실험 1과 동일하게 시행하였다.

###### 다) 혈액 콜레스테롤 농도 및 간 기능 관련 효소의 활성

실험 1과 동일하게 시행하였다.

Table 4-1. Experimental design

	Folic acid, ppm
Control	-
T1	2
T2	10
T3	20

Table 4-2. Formula and chemical composition of experimental diets<sup>1)</sup>

Ingredients (%)	Control	T1	T2	T3
Corn	65.52	65.52	65.52	65.52
Lupin seed	4.00	4.00	4.00	4.00
Soybean meal	13.96	13.96	13.96	13.96
Rapeseed meal	2.00	2.00	2.00	2.00
Meat meal	3.00	3.00	3.00	3.00
Limestone	9.51	9.51	9.51	9.51
Dicalcium phosphate	0.55	0.55	0.55	0.55
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25
Tallow	0.80	0.80	0.80	0.80
Choline-chloride (50%)	0.08	0.08	0.08	0.08
DL-Methionine	0.07	0.07	0.07	0.07
Mineral mix <sup>2)</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin mix <sup>3)</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10
Phytase	0.06	0.06	0.06	0.06
Folic acid	-	2ppm	10ppm	20ppm
Total	100.00	100.00	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 <sub>n</sub> , kcal/kg		2,800		

<sup>1)</sup> T1, 2ppm folic acid; T2, 10ppm folic acid; T3, 20ppm folic acid.

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

<sup>3)</sup> 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, 2.4mg; vitamin B1, 1.2mg; vitamin B2, 4.8mg; vitamin B6, 2.4mg; vitamin B12, 0.02mg; niacin, 15mg; pantothenic acid, 10mg; folic acid, 0.3mg.

라) 계란 내 엽산 함량

실험 6주째 얻은 계란을 할란하여 난황만 취한 후 homogenizer로 난황을 균질하게 갈아 시료로 이용하였으며, 농황산 100 ml/vol에 Folic acid 표준물질 100ppm 혼합 후 65℃에서 30분간 가온 후 여과시켜 Folic acid 표준용액을 만들었다. 샘플 0.5 g을 취하여 농황산 1 ml를 가한 후 D.W.로 50 ml까지 mass-up 한다. 65℃에서 30분간 가온하고 여과해 시험용액을 만들었다. 본 연구의 실험방법에 의한 Folic acid의 분석은 semimicro HPLC(Nano Space SI-II, Shiseido, Japan)를 사용하였다. 전처리 컬럼 이동상은 1-heptansulfonic acid 10 g을 D.W.로 100 ml까지 mass-up 한 후 acetic acid 100 ml를 섞어 200 ml로 만들어 0.5 mL/min의 유속으로 사용하였다. 농축컬럼 및 분석컬럼의 이동상은 D. W. : methanol : 전처리용액 (975/35/20, ml/ml/ml, solvent A)와 D. W. : methanol : 전처리용액 (500/500/20, ml/ml/ml, solvent B)의 2가지 용매를 사용하여 0-4.0(switching ending time) min까지 solvent B 5.0%, 4.0-21.0 min까지 solvent B 65%, 21.0-24.0 min까지 solvent B 95%, 24-26 min까지 solvent B 95%, 26-28 min까지 solvent B 5%로 program을 작성하여 분석하였다. UV-Vis 3002 model로 검출 파장을 260 nm에서 고정하여 검출하였다. 단, 기기실내의 환경조건은 온도 23±2℃ 습도 50±5%에서 수행하였다.

마) 계란 내 콜레스테롤 함량

실험 3과 동일하게 시행하였다.

바) 통계 분석

실험 1과 동일하게 시행하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 사료섭취량 및 난 생산성에 미치는 영향

산란계 사료 내 folic acid의 수준별 첨가가 사료섭취량 및 난 생산성에 미치는 영향에 대해 Table 4-3에 나타내었다. 사료섭취량, 산란율, 난중 및 일산란량 모두 처리간에 큰 차이가 없었다.

Folic acid의 추가 급여가 난 생산성에는 크게 영향을 미치지 않는 듯 하다 (House 등, 2002; Herbert 등, 2005). 대조적으로 사료 내 folic acid가 부족할 때는 난중이 감소하였다(Keshavarz, 2003).

2) 난질 및 난각질에 미치는 영향

산란계 사료 내 folic acid의 수준별 첨가가 난질 및 난각질에 미치는 영향에 대해 Table 4-4에 나타내었다. 난각강도, 난각두께 및 Haugh unit에서는 처리간에 큰 차이가 없었으나, 난황색은 대조구에 비해 folic acid를 첨가한 모든 처리구에서 유의하게 개선된 것으로 나타났다.

Folic acid 급여에 의한 난황색 개선 효과에 대해서는 유사한 연구 결과가 없어서 결과에 대해 명확히 설명할 수 없다. Keshavarz (2003)은 folic acid를 감소시킬 때에 난중의 감소와 더불어 난각질은 개선된다고 하였으며, 후기 난각질 개선을 위한 영양적 방법으로 새로운 이론을 제시한 바 있다. 본 실험에서는 folic acid를 여러 수준 별로 증가시켰으나 난각질이 개선되는 결과는 관찰되지 않았다.

Table 4-3. Effects of dietary folic acids on feed intake and laying performances in laying hens<sup>1,2)</sup>

Treatments	Control	T1	T2	T3
Feed intake, g/day/bird	145.56 ±5.56	139.04 ±1.72	139.03 ±1.58	139.89 ±2.28
Egg production rate, %	72.03 ±1.06	75.00 ±0.77	75.10 ±0.94	73.00 ±0.81
Egg weight, g/egg	67.18 ±0.26	66.23 ±0.64	66.93 ±0.38	67.08 ±0.41
Egg mass, g/hen/day	48.40 ±0.80	49.67 ±0.74	50.27 ±0.73	48.98 ±0.61

<sup>1)</sup> T1, 2ppm folic acid; T2, 10ppm folic acid; T3, 20ppm folic acid.

<sup>a-b</sup> Means ± SE. within a row with no common letter are significantly different (P<0.05).

Table 4-4. Effects of dietary folic acids on egg and eggshell qualities in laying hens<sup>1),2)</sup>

	Control	T1	T2	T3
Eggshell strength, kg/cm <sup>2</sup>	3.03 ±0.23	2.83 ±0.37	2.93 ±0.95	2.70 ±1.04
Eggshell thickness, 0.01mm	35.04 ±1.65	2.83 ±0.37	34.93 ±1.98	35.17 ±1.47
Haugh unit	83.57 ±2.85	83.17 ±2.88	82.37 ±2.17	80.07 ±2.25
Yolk color, R.C.F <sup>2)</sup>	7.37 ±0.07 <sup>b</sup>	8.00 ±0.00 <sup>a</sup>	7.87 ±0.03 <sup>a</sup>	7.87 ±0.03 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> T1, 2ppm folic acid; T2, 10ppm folic acid; T3, 20ppm folic acid.

<sup>2)</sup> Roche color fan.

<sup>a-b</sup> Means ± SE. within a row with no common letter are significantly different (P<0.05).

### 3) 계란 내 folic acid 함량에 미치는 영향

산란계 사료 내 folic acid의 수준별 첨가가 난황 내 사료섭취량 및 난 생산성에 미치는 영향에 대해 Table 4-5에 나타내었다. 난황 내 folic acid 함량은 처리간에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

House 등(2002)은 사료 내에 folic acid를 10 ppm 수준으로 첨가했을 때 난황 내에 41µg/egg까지 유의하게 증가하였다고 보고하였고, Hebert 등(2005)도 다양한 수준의 folic acid를 첨가한 연구에서 난황 내 folic acid 함량이 증가하는 결과를 관찰하였다. 그러나 folic acid 첨가 수준이 2 ppm을 초과하여도 계란 내에는 더 이상 전이되지 않는다고 하였다(Hebert 등, 2005). 본 실험에서는 folic acid를 20 ppm까지 추가 급여하였으나 난황 내로 전이되지 않는 결과가 관찰되었다. 이는 기초사료에 프레믹스의 형태로 folic acid가 0.3 ppm 정도 함유되어 있었던 점과 folic acid의 분석 상의 문제가 그 원인인 것으로 추측된다.

### 4) 혈액 성분에 미치는 영향

산란계 사료 내 folic acid의 수준별 첨가가 혈액 성분에 미치는 영향에 대해 Table 4-6에 명시하였다. 혈액 총 콜레스테롤 농도에서는 처리간에 차이가 없었으나, HDL-C 농도는 대조구에 비해 folic acid를 첨가한 모든 실험구에서 유의하게 증가하였다. HDL-C/TOTAL-C 비율에서는 유의한 차이가 인정되지 않았다.

산란계에서 folic acid의 첨가 효과를 연구한 자료에서는 혈액 성분의 변화에 대해 조사하지 않았기 때문에 본 결과를 설명하기 어렵다. HDL-C는 항동맥경화 인자로서 folic acid 급여 후 인체에서는 HDL-C 농도가 일관되게 증가한다고 하였다 (Villa 등, 2005). GOT 및 GPT 활성에서도 처리간에 유의한 차이는 발견되지 않았으며, 이는 folic acid의 추가 공급이 생리적 반응에는 크게 영향을 미치지 않음을 시사한다.

Table 4-5. Effects of dietary folic acids on the contents of folic acid of eggs in laying hens<sup>1,2)</sup>

	Control	T1	T2	T3
Egg yolk, $\mu\text{g}/\text{egg}$	12.58 $\pm$ 1.17	13.58 $\pm$ 3.62	10.71 $\pm$ 3.12	10.63 $\pm$ 1.19

<sup>1)</sup> T1, 2ppm folic acid; T2, 10ppm folic acid; T3, 20ppm folic acid.

<sup>2)</sup> Means  $\pm$  SE. (n=4).

Table 4-6. Effects of dietary folic acids on various blood profiles in laying hens<sup>1,2)</sup>

	Control	T1	T2	T3
TOTAL-C, mg/100ml	118.83 $\pm$ 8.63	110.50 $\pm$ 4.10	112.86 $\pm$ 3.45	105.78 $\pm$ 7.33
HDL-C, mg/100ml	46.37 $\pm$ 1.11 <sup>b</sup>	49.63 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	49.31 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	49.31 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>
HDL-C/TOTAL-C	0.44 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.04	0.44 $\pm$ 0.01	0.51 $\pm$ 0.04
GOT, U/L	151.72 $\pm$ 6.75	154.31 $\pm$ 2.38	143.62 $\pm$ 3.37	152.27 $\pm$ 2.28
GPT, U/L	11.46 $\pm$ 0.78	10.44 $\pm$ 0.62	9.18 $\pm$ 0.39	10.14 $\pm$ 0.29

<sup>1)</sup> Abbreviation : TOTAL-C, total cholesterol; HDL-C, high density-cholesterol; GOT, glutamic-oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic-pyruvic transaminase.

<sup>2)</sup> T1, 2ppm folic acid; T2, 10ppm folic acid; T3, 20ppm folic acid.

<sup>a-b</sup> Means  $\pm$  SE. within a row with no common letter are significantly different (P<0.05).



5) 계란 내 각 지질 분획에 미치는 영향

산란계 사료 내 folic acid의 수준별 첨가가 난황 내 사료섭취량 및 난 생산성에 미치는 영향에 대해 Table 4-7에 나타내었다. 난황 내 총 콜레스테롤, 중성지질 및 인지질 함량은 처리간에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

6) 관능적 특성에 미치는 영향

산란계 사료 내 folic acid의 수준별 첨가가 난황 내 사료섭취량 및 난 생산성에 미치는 영향에 대해 Table 4-8에 나타내었다. 계란의 풍미 및 전체적 선호도에서 처리간에 큰 차이는 없었으며, 이는 folic acid의 추가 급여가 생산된 계란의 관능적 특성에 부정적인 영향을 미치지 않음을 의미하는 것으로 생각된다.

Table 4-7. Effects of dietary folic acids on the contents of various lipid fractions of egg yolks in laying hens<sup>1,2)</sup>

	Control	T1	T2	T3
	----- mg/g -----			
Cholesterol	13.93 ±0.24	13.78 ±0.32	13.93 ±0.50	13.21 ±0.46
Triacylglycerol	196.54 ±5.17	185.57 ±3.67	197.59 ±8.89	191.22 ±9.92
Phospholipid	73.00 ±2.37	71.25 ±2.90	67.25 ±2.19	66.35 ±4.39

<sup>1)</sup> T1, 2ppm folic acid; T2, 10ppm folic acid; T3, 20ppm folic acid.

<sup>2)</sup> Means ± SE. (n=4).

Table 4-8. Effects of dietary folic acids on sensory evaluation of egg in laying hens

	Control	T1	T2	T3
Flavor	7.68	7.64	7.72	7.69
Overall	7.77	7.75	7.81	7.76

<sup>1)</sup> T1, 2ppm folic acid; T2, 10ppm folic acid; T3, 20ppm folic acid.

<sup>2)</sup> Mean (n=8).

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구는 세부 1과제에서는 저 콜레스테롤 계란 및 유효성분을 함유하는 고부가가치 계란 생산을 목적으로 수행하였다. 미생물계 및 천연물질의 단독급여 및 미생물계, 천연물질 및 유효광물질의 혼합급여가 계란 콜레스테롤 함량에 미치는 영향 조사함으로써 저콜레스테롤 계란 생산에 대한 기초자료 및 산업화와 관련된 결과물을 얻어 내었으며 일반 대조구에 비해 콜레스테롤 함량이 최대 30% 감소된 저콜레스테롤 계란을 생산할 수 있었다. 또한 생화학적, 분자생물학적 분석기법을 도입하여 콜레스테롤 대사에 대한 생화학적, 분자생물학적 분석(TLC-FID, Real-time PCR)으로 산란계에서의 콜레스테롤 대사의 기초자료 및 새로운 분석 방법을 제시하였다.

세부 2과제에서는 유효 광물질 (셀레늄, 구리의 무기태와 유기태)의 첨가수준별 이행효율 조사, 생리활성물질(라이코펜)의 첨가수준별 이행효율의 조사와 타우린, 카니틴 및 folic acid의 첨가수준별 이행효율의 조사함으로써 계란 내로의 전이를 확인하였으며, 계란 내 유효성분 함량이 증가된 고품질 기능성 계란을 생산을 위한 효율적 방법을 제공할 수 있었다.

본 연구 결과들을 적절히 활용함으로

- ◎ 저렴한 비용의 고 부가가치의 기능성 계란 생산기술의 개발
- ◎ 고 부가가치 계란 생산을 통한 농가소득 증대에 기여
- ◎ 계란에 대한 소비자의 인식 개선 및 수요 창출
- ◎ 콜레스테롤 대사 관련 기초자료 제공 등의 효과를 얻은 것으로 판단하고 있다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

계란의 소비가 정체된 원인은 여러 가지 이유로 다양하지만, 계란 내 콜레스테롤 함량이 비교적 높다는 면이 큰 요인일 수 있다. 특히 건강을 우선시하는 소비자에게 저 콜레스테롤 계란 및 유효영양성분이 효율적으로 강화된 계란의 공급은 계란에 대한 부정적인 이미지의 해소에 도움이 될 것으로 사료된다. 최근 조류독감과 같은 악재로 계란의 소비가 격감하는 상황에서 부담없는 가격의 기능성 계란은 계란의 새로운 소비를 창출하는 방법이 될 수 있을 것이다.

현재 기능성 계란 생산을 위해서는 고가의 특화 사료를 구입 급여하기 때문에 소비자 가격이 높게 설정될 수밖에 없는 구조이다. 그러나 콜레스테롤 저감 계란 및 영양성분 강화 계란의 생산을 위한 본 연구에서 시험할 원료들을 활용할 경우 현재보다 비교적 저렴한 기능성 사료(사료 kg당 10-15원 정도의 원가 상승 예상)의 생산이 가능할 것으로 판단된다.

시중에 유통되는 저 콜레스테롤 계란은 일반계란에 비해 약 3배 이상 고가로 팔리고 있으며, 1일 판매량 역시 20,000개로 매우 제한적이다. 따라서 농가에서 기능성 계란의 생산을 통해 얻는 부가가치는 그리 높지 않다. 이에 따라 저비용 투입으로 보다 많은 양의 기능성 계란을 생산한다면 양계농가의 소득이 증대될 수 있을 것이다.

본 연구실에서는 콜레스테롤 관련 실험결과를 바탕으로 저 콜레스테롤 계란 생산 기술의 특허에 대한 준비를 할 예정이며, 고품질 계란 생산을 위한 특화 사료의 생산 및 농가보급에 대한 데이터를 수립할 예정이다. 또한 본 실험을 통해 기존의 콜레스테롤 대사에 대한 접근 방법에 생화학적, 분자생물학적 분석 기법을 도입함으로써, 다양한 분석 방향과 기초자료를 제시한 것으로 사료된다. 본 실험을 통해 나온 자료들은 추후 보충작업을 통해 국내외 학회지에 논문으로써 발표할 예정이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 산란계 사료 내 키토산의 첨가 급여에 의해 난황 콜레스테롤 함량이 감소하였고, 인지질 함량은 1.8배 증가하는 효과가 시사되었다(Vrzhenskaia 등, 2005).

- 콜레스테롤 생합성 억제제인 pravastatin을 산란계에게 급여했을 때 난황 콜레스테롤이 일반 계란에 비해 20% 감소하였다(Kim 등, 2004)

- 마늘분말 급여 후 생산된 계란(egg yolk-enriched garlic powder, EGP)를 이용한 연구에서 HL 60 cell로부터 peroxide 생산을 억제하였으며 추후 인체에서 동맥경화의 예방을 위해 효율적으로 이용할 수 있을 것이다(Yamaji 등, 2004)

- 마늘 추출물(garlic paste)를 산란계에 급여했을 때 난 생산성에 부정적인 영향을 미치지 않으면서 혈청 콜레스테롤 뿐 아니라 난황 내 콜레스테롤 함량을 감소시키는 효과가 관찰되었다(Chowdhury 등, 2002).

- 10% 마늘즙을 살포했을 때 산란계에서 생산성을 저하시키는 원인인 진드기(fowl mite)를 효과적으로 감소시킬 수 있었다(Birrenkoff 등, 2000).

- 우수한 균주로 구성된 생균제를 산란계에게 공급하면 난 생산성과 난질이 향상될 뿐 아니라 계란 내 콜레스테롤 함량이 감소하는 결과가 나타났다(Kurtoglu 등, 2004; Panda 등, 2003).

- 사료를 통한 무기태 및 유기태 셀레늄의 공급으로 계란 내 셀레늄 함량을 증가시킬 수 있는데, 이행 효율에 대해서는 무기태와 유기태간에 큰 차이가 없다는 결과(Jiakui와 Xiaolong, 2004)와 유기태 셀레늄이 더 효율적이라는 결과(Payne 등, 2005)가 모두 보고되었다.

- 산란계 사료 내 구리의 체내 이행은 다른 미량광물질에 비해 비효율적인 것으로 나타났다(Skrivan 등, 2005)

- Lycopene을 100 ppm 수준으로 급여했던 연구에서 난 생산성이 향상되고 Haugh unit가 개선되는 효과가 관찰되었다(Sahin 등, 2004).

- 정제 타우린을 산란계에 급여했을 때 난중이 감소하는 영향이 있었으며 (Yamazaki와 Takemasa, 1998) 이를 적절히 이용하면 후기 난각질의 개선 효과를 얻을 수 있을 것이다.

- 정제 카니틴(L-carnitine) 급여는 난백고를 개선함으로써 계란의 외관적 품질을 향상시키는데(Rabie 등, 1997), 이러한 효과는 고온 사육조건에서 더 좋은 영향으로 나타날 수 있다(Celik 등, 2004)

- 계란 내 folic acid 함량은 사료로서 folic acid를 급여함으로써 증가하지만, 일정 수준에서 계란 내로의 이행이 한계에 도달한다(Hebert 등, 2005).

- Folic acid의 습관적 섭취는 혈장 내 homocystein 수준을 낮추고 인슐린과 지질대사를 개선시킴으로서 궁극적으로 관상심장질환을 예방하는 효과가 있다(Villa 등, 2005).

## 제 7 장 참고문헌

- al Ankari, A., H. Najib, and A. al Hozab , 1998. Yolk and serum cholesterol and production traits, as affected by incorporating a supraoptimal amount of copper in the diet of the leghorn hen. *Br Poult Sci.* 39(3):393-7.
- An, B. K., H. Nishiyama, K. Tanaka, S. Ohtani, T. Iwata, K. Tsutsumi, and M. Kasai, 1997. Dietary safflower phospholipid reduces liver lipids in laying hens. *Poultry Sci.* 76:689-695.
- AOAC., 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Balevi, T., and B. Cokun, 2004. Effect of dietary cupper on production and egg cholesterol content in laying hens. *Br. Poult.Sci.* 45(4):530-534.
- Birrenkott, G. P., G. E. Brockenfelt, J. A. Greer, and M. D. Owens, 2000. Topical application of garlic reduces northern fowl mite infestation in laying hens. *Poult Sci.* 79(11):1575-1577.
- Boileau, T. W-M., S. K. Clinton, and J. W. Erdman Jr, 2000. Tissue lycopene concentrations and isomer patterns are affected by androgen status and dietary lycopene concentration in male F344 rats. *J. Nutr.*, 130:1613-1618.
- Celik, L. B., A. Tekeli, and O. Ozturkcan, 2004. Effects of supplemental L-carnitine in drinking water on performance and egg quality of laying hens exposed to a high ambient temperature. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 88(5-6):229-233.
- Chomczynski P., and N. Sacchi, 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *N. Anal. Biochem.* Apr;162(1):156-159.
- Chowdhury, S. R., S. D. Chowdhury, and T. K. Smith, 2002. Effect of dietary

- garlic on cholesterol metabolism in laying hens. *Poultry Sic.* 81:1856-1862.
- Dotas, D., S. Zamanids, and J. Balios, 1999, Effect of dried tomato pulp on performance and egg traits of lay hens. *Br. Poult. Sci.* 40:695-697.
- Duncan, D. B., 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometric.* 11:1-4.
- Folch J., M. Lees, and G. H. Sloane-Stanley, 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.
- Hebert, K., J. D. House, and W. Guenter, 2005. Effect of dietary folic acid supplementation on egg folate content and the performance and folate status of two strains of laying hens. *Poultry Sci.* 84:1533-1538.
- House, J. D., K. Braun, D. M. Ballance, C. P. O'Connor, and W. Guenter, 2002. The enrichment of eggs with folic acid through supplementation of the laying hen diet. *Poultry Sci.* 81:1332-1337.
- Jiakui, L., and W. Xiaolong, 2004. Effect of dietary organic versus inorganic selenium in laying hens on the productivity, selenium distribution in egg and selenium content in blood, liver and kidney. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18(1):65-8.
- Jiang, Y. H., R. B. McGeachina, and C. A. Bailey, 1994.  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene, and retinol enrichment of chicken eggs, *Poult. Sci.* 73:1137-1143.
- Kang, D. K., S. I. Kim, C. H. Cho, Y. H. Yim, and H. S. Kim, 2003. Use of lycopene, antioxidant carotenoid, in laying hen for egg yolk pigmentation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 16:1799-1803.
- Keshavarz, K., 1996. The effect of different levels of vitamin C and cholecalciferol with adequate or marginal levels of dietary calcium on performance and

- eggshell quality of laying hens. *Poultry Sci.* 75:1227-1235.
- Kim, J. H., S. T., Hong, H. S. Lee, and H. I. Kim, 2004. Oral administration of pravastatin reduces egg cholesterol but not plasma cholesterol in laying hens. *Poult Sci.* 83(9):1539-43.
- Kurtoglu, V., F. Kurtoglu, E. Seker, B. Coskun, T. Balevi, E. S. Polat, 2004. Effect of probiotic supplementation on laying hen diets on yield performance and serum and egg yolk cholesterol. *Food Addit. Contam.* 21(9):817-823.
- Leibetseder J., 1995. Effects of L-carnitine in poultry. *Arch. Tierernahr.* 48(1-2):97-108.
- Lim, K. S., S. J. You, B. K. An, and C. W. Kang, 2006. Effects of dietary garlic powder and copper on cholesterol content and quality characteristics of chicken eggs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 19:582-586.
- Lumeij, J. T., 1997. Avian Clinical Biochemistry. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (ed. J. J. Kanebo, J. W. Harvey, and M. L. Bruss, 5th) Academic Press. pp. 857-883.
- Mabe, I., C. Rapp, M. M. Bain, and Y. Nys, 2003. Supplementation of a corn-soybean meal diet with manganese, copper, and zinc from organic or inorganic sources improves eggshell quality in aged laying hens. *Poult Sci.* 82(12):1903-13.
- Mark, L. A., D. M. Sullivan, R. L. Smith, and E. F. Richer, 1986. Evaluation of direct saponification method for determination of cholesterol in meat. *J. Asso. Off. Anal. Chem.* 69(5):844-846.
- Naber, E. C., 1979. The effect of nutrition on the composition of eggs. *Poultry Sci.* 58:518-528.
- NRC, 1994. Nutrient requirements of poultry. 9th ed. National Academy Press.



Washington D.C.

- Ollilainen, V., M. Heinonen, E. Linkola, P. Voro, and P. Koivistoinen, 1989. Carotenoids and retinols in finnish foods: dairy products and eggs. *J. Dairy Sci.* 72:2257-2265.
- Panda, A. K., M. R. Reddy, S. V. Rama Rao, and N. K. Praharaj, 2003. Production performance, serum / yolk cholesterol and immune competence of white leghorn layer as influenced by dietary supplementation. *Trop. Anim. Health Prod.* 35(1):85-94.
- Payne, R. L., T. K. Lavergne, and L. L. Southern, 2005. Effect of inorganic versus organic selenium on hen production and egg selenium concentration. *Poult Sci.* Feb;84(2):232-7.
- Pearce, J., N. Jackson and M. H. Stevenson, 1983. The effects dietary intake and of dietary concentration of copper sulphate on the laying domestic fowl : Effect of some aspect of lipid, carbohydrate and amino acid metabolism. *Br. Poult. Sci.* 24:337-348.
- Pesti, G. M., and R. I. Bakalli, 1998. Studies on the feeding of cupric sulfate pentahydrate to the laying hens on egg cholesterol content. *Poultry Sci.* 77(10):1540-1545.
- Qureshi, A. A., Z. Z. Dinc, N. Abuirmeileh, W. C. Burger, Y. Ahmad, and C. E. Elson, 1983. Suppression of avian hepatic lipid metabolism by solvent extract of garlic: Impact on serum lipids. *J. Nutr.* 113:1746-1755.
- Rao, A. V., and S. Agarwal, 1999. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review, *Nutrition Research*, 19:305-323.
- Reddy, R. V., S. F. Lightsey and D. V. Maurice, 1991. Research note: Effect of feeding garlic oil on performance and egg yolk cholesterol concentration. *Poultry Sci.* 70:2006-2009.

- Rissanen, T., S. Voutilainen, K. Nyyssonen, and J. T. Salonen, 2002. Lycopene, atherosclerosis, and coronary heart disease. *Exp. Biol. Med.* 227:900-907.
- Sahin, K., N. Sahin, and M. Onderci, 2002. Vitamin E supplementation can alleviate negative effects of heat stress on egg production, digestibility of nutrients and egg yolk mineral concentration of Japanese quails. *Res. Vet. Sci.*, 73:307-312.
- Sahin, K., R. Ozercan, M. Onderci, N. Sahin, M. F. Gursu, F. Khachik, F. H. Sarkar, A. Munkarah, R. Ali-Fehmi, D. Kmak, and O. Kucuk, 2004. Lycopene supplementation prevents the development of spontaneous smooth muscle tumors of the oviduct in Japanese quail. *Nutr, Cancer*.50(2):181-9.
- Sahin, N., K. Sahin, and M. Onderci, 2003. Vitamin E and selenium supplementation to alleviate cold-stress-associated deterioration in egg quality and egg yolk mineral concentrations of Japanese quails. *Biol. Trace Elem. Res.* 96:179-189.
- Skrivan, M., V. Skrivanova', and M. Marounek, 2005. Effects of dietary Zinc, Iron, and Copper in layer feed on distribution of these elements in eggs, liver, excreta, soil, and herbage. *Poultry Sci.* 84:1570-1575.
- Stefan, M., and M. Gudrun, 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47:469-474.
- Tompson, R. H., and G. V. Merola, 1993. A simplified alternative to the AOAC official method for cholesterol in multicomponent foods. *J. AOAC Inter.* 76:1057-1068.
- Utterback, P. L., C. M. Parsons, I. Yoon, and J. Butler, 2005. Effect of supplementing selenium yeast in diets of laying hens on egg selenium content. *Poultry Sci.* 2005 84(12):1900-1901.

- Villa, P., C. Perri, R. Suriano, F. Cucinelli, S. Panunzi, M. Ranieri, C. Mele, and A. Lanzone, 2005. L-folic acid supplementation in healthy postmenopausal women: effect on homocysteine and glycolipid metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90(8):4622-9.
- Vrzhesinskaia, O. A., I. V. Filimonova, O. V. Kodentsova, N. A. Beketova, and V. M. Kodentsova, 2005. Influence of chitosan feeding of laying hens on egg vitamin and cholesterol content. *Vopr Pitan.* 74(3):28-31.
- Wei, Y., T. Zhang, G. Xu, and Y. Ito, 2001. Application of analytical and preparative high-speed counter-current chromatography for separation of lycopene from crude extract of tomato paste. *J. of Chromatography A.*, 929:169-173.
- Williams, K. C., 1992. Some factors affecting albumen quality with particular reference to Haugh unit score. *World's Poult. Sci. J.* 48:5-16.
- Yamaji, K., K. P. Sarker, K. Abeyama, and I. Maruyama, 2004. Anti-atherogenic effects of an egg yolk-enriched garlic supplement. *Int J Food Sci Nutr.* 55(1):61-66.
- Yamazaki, M., and M. Takemasa, 1998. Effects of Dietary Taurine on Egg Weight. *Poultry Sci.* 77:1024-1026.
- 김정학, 심관섭, 박강희, 2002. 타우린 첨가가 산란계의 난 생산성 및 난질에 미치는 영향. *한국가금학회지* 29(3):171-176.
- 박강희, 2002. 사료내 타우린 첨가가 산란계의 지방대사에 미치는 영향. *한국가금학회지* 29(2):95-100.
- 윤병선, 채현석, 김석철, 김동운, 안종남, 김용곤, 1998. 산란계에 대한 마늘의 급여효과. *한국영양사료학회지* 23(3):357-362.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

[부 표]

## 인 쇄 내 용

### I. 인쇄규격

1. 크 기 : 4×6배판(가로 188mm×세로 259mm)
2. 제 본 : 좌철
3. 용 지 : ○ 표지 200 g/m. 양면 아트지  
○ 내용 80 g/m. 모조지
4. 인쇄방식 :
  - 1) 표지 : 바탕 백색, 활자 흑색
  - 2) 내용 : 흑색 지정활자로 인쇄 한다
  - 3) 양면인쇄

### II. 편집순서

1. 표 지
2. 제출문
3. 요약문
4. Summary
5. Contents
6. 목 차
7. 본 문
8. 뒷면지

### III. 참고사항