



산란말기 사료 내 *Bacillus subtilis*와 오레가노 오일 첨가가 산란계의 계란 생산성, 계란품질 및 장의 형태학적 특성에 미치는 영향

김현수^{1*} · 김희진^{2*} · 윤연서³ · 이우도² · 신혜경³ · 손지선¹ · 홍의철¹ · 전익수⁴ · 강환구^{1†}

¹국립축산과학원 가금연구소 농업연구사, ²국립축산과학원 가금연구소 박사후연구원,
³국립축산과학원 가금연구소 연구원, ⁴국립축산과학원 가금연구소 농업연구관

Effects of Dietary *Bacillus subtilis* and Oregano Oil Supplementation on Performance, Egg Quality, and Intestinal Morphology in Late-Phase Laying Hens

Hyunsoo Kim^{1*}, Hee-Jin Kim^{2*}, Yeon-Seo Yun³, Woo-Do Lee², Hyekyoung Shin³, Jiseon Son¹,
 Eui-Chul Hong¹, Ik Soo Jeon⁴ and Hwan-Ku Kang^{1†}

¹Researcher, Poultry Research Institute, National Institute of Animal Science, Pyeongchang 25342, Korea

²Post-Doctor, Poultry Research Institute, National Institute of Animal Science, Pyeongchang 25342, Korea

³Assistant Researcher, Poultry Research Institute, National Institute of Animal Science, Pyeongchang 25342, Korea

⁴Senior Researcher, Poultry Research Institute, National Institute of Animal Science, Pyeongchang 25342, Republic of Korea

ABSTRACT This study aimed to investigate the impact of *Bacillus subtilis*-based probiotics and oregano essential oil on the production performance, egg quality, and intestinal morphology of late-phase laying hens (69-weeks). A total of 150 laying hens of 69-week-old were randomly allotted into 6 treatment groups with 5 replicates of 5 birds in each replicate. Laying hens were divided into high (H) and average (A) egg production groups prior to the trial. The hens in each group were supplemented with *Bacillus subtilis*, or oregano essential oil: CON, a basal diet; BS, basal diet plus 3×10^8 CFU/kg feed *Bacillus subtilis*; OEO, basal diet plus 0.3 g/kg feed oregano essential oil. Egg performance, blood characteristics, egg quality, and intestinal morphology of the late-phase laying hens were evaluated. Both BS and OEO significantly enhanced ($P < 0.05$) egg production compared to CON in high egg production. The blood characteristics indicated no significant differences based on the egg production and the supplementation of BS and OEO in the late-phase laying hens. The eggshell strength was significantly improved ($P < 0.05$) in both OEO compared to both CON. A significantly decreased ($P < 0.05$) the villus height to crypt depth ratio (VH/CD) in the ileum compared to H, and in the treatment groups supplemented with BS and OEO, VH/CD showed a significant increase ($P < 0.05$) compared to both CON. These results suggest that the supplementation of *Bacillus subtilis* and oregano essential oil in the diet of late-phase laying hens could serve as a potential strategy to enhance egg production, egg quality, and gut health.

(Key words: laying hens, probiotics, essential oil, performance, gut health)

서론

산란계 산업은 전 세계적으로 지속 가능한 식량을 공급하기 위해 중요한 사업 중 하나이다(Wang et al., 2019). 산란 말기(55주 이후)는 산란계의 생산성이 저하되고, 산란 피크 기간인 것에 비하여 계란의 품질 특히 난각 품질이 저하되어 산란계 산업에 경제적인 손실이 발생한다(Van Den

Brand et al., 2004). 또한 생산 후기 산란계 계란의 생산성 저하와 계란 품질의 저하되는 이유 중 하나는 장 기능의 저하이다(Rattanawut et al., 2018). 연령의 증가로 장의 근육층이 얇아지고, 용모가 짧아지고 밀도가 감소하고, 장점막 시스템의 기능이 저하될 수 있으며, 세포의 보호 메커니즘의 활성이 감소되어 어린 산란계에 비하여 장염증 반응에 민감하다(Jing et al., 2014; Sovran et al., 2019). 따라서, 산란말기

* These authors have contributed equally to this work.

† To whom correspondence should be addressed : magic100@korea.kr

장 기능을 개선하는 물질 급여는 산란율과 계란의 품질을 향상시킬 것이라 사료된다.

프로바이오틱스는 세계보건기구에서 “적절한 양을 투여했을 때 숙주에게 건강상의 이점”을 주는 살아있는 미생물로 정의하고 있다. 프로바이오틱스는 장내 미생물 안정화, 면역력 향상, 병원체 감소, 염증 감소, 암모니아 수치 감소, 휘발성 지방산 생성 증가, 비타민 B 합성 강화 등 다양한 기능을 한다(Hahn-Didde and Purdum, 2016). 또한, 프로바이오틱스의 가장 중요한 점은 가금류의 장내 미생물 중 병원성 미생물의 활성을 억제하여 폐사를 감소시켜 이로 인한 농장의 경제적인 손실은 낮추고, 소비자가 계란에 있는 병원성 미생물의 위험에 노출되는 확률을 낮춘다(Hahn-Didde and Purdum, 2016). 프로바이오틱스에는 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pedococcus*, *Leuconostoc* 및 *Bacillus* 등이 포함되어 있다(Hahn-Didde and Purdum, 2016). 그 중 *Bacillus*는 혹독한 환경에 대한 저항성이 더 높기 때문에 산란계의 사료 보충제로 많이 사용되고 있다(Deng et al., 2012). 또한 *Bacillus subtilis*는 닭의 생리학적, 생화학적 특성이 유사하며 α -amylases, β -amylases, lipases, proteases 등 다양한 세포 외 효소를 생산하여 장내 소화율을 향상시켜 영양분 흡수 및 면역 기능을 향상시킨다고 알려져 있다(Li et al., 2014).

Essential oil(EO)은 식물(꽃, 풀, 씨앗, 잎 등)에서 추출한 방향성 유성의 액체로, 향균 특성으로 인해 가축 사육을 위한 항생제 대체제로 언급되고 있다(Ibrahim et al., 2021). EO의 급여로 육계 및 돼지의 장에서 *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* 및 *Campylobacter jejuni* 등 병원성 미생물의 활성이 억제되었다(Ibrahim et al., 2021). 특히, Oregano essential oil(OEO)은 강력한 생리활성 물질인 thymol과 carvacrol 등이 함유하고 있으며(Lambert et al., 2001), 그 중 thymol 및 carvacrol은 원형질막의 지질 부분을 분해하여 막 구조를 교란하고 투과성을 변형시켜 항균 활성을 가져오며(Lambert et al., 2001), 또한 항산화, 항진균 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Feng et al., 2021). OEO는 육계 건강한 장과 장벽 기능을 유지하고, 면역 체계 활동을 강화하며, 장내 미생물을 조절함으로써 장 건강에 유리한 효과를 발휘할 수 있다(Meligy et al., 2023). OEO는 가금류의 생산성 향상 등에 대한 긍정적인 효과에 대한 연구들이 진행되고 있다(Feng et al., 2021; Meligy et al., 2023).

산란 말기 산란율 차이에 대한 계란 생산성 및 계란 품질, 장 건강 차이에 대한 연구가 부족한 실정이다. 게다가 산란

말기 연령이 증가할수록 산란율과 계란 품질은 계속해서 감소할 것으로 예상되며, 이에 대한 효과적인 개선 방안이 필요할 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 산란 말기 산란율과 장건강 물질(*Bacillus subtilis*와 Oregano essential oil)의 급여로 인한 산란계의 생산성과 계란 품질, 혈구, 혈청 생화학, 장 조직학적 차이를 살펴보기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 사양관리 및 실험 설계

본 시험은 농촌진흥청 국립축산과학원 실험동물윤리위원회 관리기준에 의거하여 수행하였다(승인번호: 2021-508). 69주령 Hy-Line brown 산란계 150수를 이용하였으며, 시험 전 3주간 개체별로 산란율을 조사하여 산란율이 다른 두 그룹에서 산란율 100%(H)와 평균(A, 88%~89%) 총 두 그룹으로 나누었다. 산란율 차이에 따른 두 그룹에서 각각 대조군(CON)은 상업용 시판사료를 급여하였으며, BS군은 대조군 사료에 3×10^8 CFU/kg *Bacillus subtilis*를 첨가하였고, OEO 그룹은 대조군 사료에 사료용 Oregano essential oil 0.3 g/kg을 첨가하였다. 따라서, 총 6처리로 하여 처리당 5반복, 반복당 5수를 완전 임의 배치하였으며, 5주간 케이지시설에서 사양시험을 실시하였다.

대조군사료는 옥수수과 대두박을 기초로 하여 대사에너지는 2,600 kcal/kg, 조단백질은 14.5%인 가루 형태의 산란말기 시판 사료를 이용하였다. 첨가제인 *Bacillus subtilis*는 미국 Danisco에서 시판되고 있는 Envia Pro 201 GT제품을 사용하였으며, Oregano essential oil은 영국 Anpario Plc.에서 시판되고 있는 Orego-stim을 사용하였다. 각 시험 사료는 사료배합기(DKM350SU, Daekwang Co., Ltd., Hwaseong, Korea)를 사용하여 5분간 혼합하여 제공하였다.

2. 조사항목

1) 생산성 분석

산란율 및 장건강 물질 급여에 따른 생산성 분석 항목은 산란율(%), 난중(g), 산란량, 사료섭취량(g/bird/day) 및 사료 요구율을 조사하였다. 산란율을 조사하기 위해서 매일 오후 2시에 집란하여 일주일 단위로 산란율을 조사하였으며, 산란율과 난중은 수 단위로 조사하였으며, 산란량은 산란율과 평균 난중을 곱하고 100으로 나누어 하루에 낳는 계란의 무

계로 계산하였다. 사료 잔량은 1주 단위로 조사하여 수 당 일일 사료섭취량을 계산하였다. 사료요구율은 산란량을 일일사료섭취량으로 나누어 계산하였다.

2) 혈구 분석

산란을 및 장건강 물질 급여에 따른 혈구 분석을 위해 5주 사양 실험 종료 후 처리구당 10수씩 총 60수를 랜덤 선발하여 익하 정맥에서 혈액 1 mL를 채취하여, 혈구 분석을 위해 혈액이 응고되지 않도록 하는 EDTA(ethylene diamine tetraacetic acid)가 처리된 튜브에 나눠 담았다. 샘플링 후 혈구 분석은 24시간 내에 자동 혈구 분석기(AU480 Chemistry Analyzer, Beckman Coulter Inc., CA, USA)를 이용하여 혈구(백혈구, 적혈구 및 혈소판)를 분석하였다.

3) 혈청 생화학 분석

산란을 및 장건강 물질 급여에 따른 혈청 생화학 분석을 위해 5주 사양실험 종료 후 처리구당 10수씩 총 60수를 랜덤 선발하여 익하 정맥에서 혈액 2 mL를 serum separate tube에 채취하였다. 채취한 혈액은 원심 분리하여(3,000 rpm, 4°C, 20 min) 상층액(혈청)을 분리하여 분석 전까지 -80°C에 보관하였다. 혈청 생화학 분석은 혈액분석기(AU480 Chemistry Analyzer, Beckman Coulter Inc., CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

4) 계란품질 조사

계란 품질 조사를 위하여 시험 마지막 주에 산란된 계란을 랜덤으로 처리구 당 60개를 수집하였다. 난각 강도는 계란의 둔단부에 압력을 가하여 파각되는 순간의 힘을 측정하는 난각강도계(Egg shell force gauge model II, Robotmation Co., Ltd, Japan)를 이용하였다. Haugh units, 난중, 난백고 및 난황색 조사를 위하여 계란품질자동분석기(QCM+, Technical services & supplies Ltd., Engla)를 사용하여 측정하였다. 난각두께는 모두 동일 부분을 채취하여 난각막을 제거한 뒤 Digimatic micrometer(Series 547-360, Mitutoyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

5) 회장의 조직학적 분석

산란을 및 장건강 물질 급여에 따른 회장의 형태학적 분석을 위해 5주 사양실험 종료 후 처리구당 10수씩 총 60수를 랜덤 선발하여 산란계의 회장의 3 cm를 샘플링(Meckel's diverticulum에서 회맹접합부에서까지의 1/3 부분)했다. 그 후 회장을 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 에탄올로 탈

수 시킨 후 파라핀으로 고정하여 rotary microtome(Leica Jung Histocut 820, Leica, Nussloch, Germany)을 사용하여 5 µm 두께로 슬라이스하였다. 슬라이스한 조직은 hematoxylin & eosin(H&E) 시약으로 고정하여 현미경으로 이미지(Nikon DS-Ri2, Nikon, Tokyo, Japan)를 얻었으며, 조직학적 분석은 imaging software(NIS-Elements BR 4.0, Nikon, Tokyo, Japan)을 사용하여 분석하였다.

3. 통계처리

산란을 및 장건강 물질 급여에 따른 생산성 및 혈구, 혈청 생화학, 계란 품질, 장 형태학적 변화에 미치는 영향에 대하여 SAS의 General Linear Model(GLM)을 이용하여 two-way ANOVA로 분석하였으며, 처리구 간에 따른 차이를 분석을 위해 Duncan's Multiple Range Test를 이용하여 $P < 0.05$ 수준에서 평균값 간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 생산성

산란말기 생균제(*Bacillus subtilis*, BS), Oregano essential oil(OEO) 급여에 따른 생산성 결과는 Table 1에 나타내었다. 난중, 산란량, FCR은 처리구 간에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 사료 섭취량은 산란율과 첨가제에 따른 상호작용 효과를 나타내었다($P < 0.05$). 산란율은 H가 A보다 유의적으로 높은 산란율을 보였으며($P < 0.05$), 시험 시작 전 산란율이 평균인(A) 처리구에서 CON(86.80%)과 비교하여, BS(91.69%) 및 OEO(91.94%)에서 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$).

산란계의 생리적인 노화는 산란계의 생산 능력을 감소시킨다(Forte et al., 2016). 동물의 생산 능력을 촉진하기 위하여 항생제를 사용해 왔지만, 항생제 남용과 이에 따른 축산물(계란, 고기, 우유 등)의 잔류 등에 문제가 발생하고 있어, 현재 항생제 사용에는 어려움이 있다. 이에 따라 산란계의 건강과 생산성 향상을 위하여 생균제와 Oregano oil과 같은 EO에 관심이 높아지고 있다(Zeng et al., 2015). 생균제 중 BS는 식물의 복합 탄수화물을 분해하는 강력한 proteases, lipases 및 amylases를 분비하여 사료의 영양소를 분해하여 소화율을 높여 닭 등의 동물에게 더 많은 영양소를 섭취할 수 있도록 한다(Gao et al., 2017). OEO는 항균 및 항염증 특성을 갖고 있으며, 장의 건강 및 섭취한 영양소 소화와 흡수를 돕는다고 알려져 있다(Lambert et al., 2001). 따라서 산란말기 높은 산란율을 가진 산란계에서는 장건강 물질의 효과

Table 1. Effect of dietary *Bacillus subtilis* and oregano essential oil supplementation on production performance of late-phase laying hens

	Egg production (%)	Egg weight (g)	Egg mass	Feed consumption (g/bird/day)	Feed conversion ratio	
Egg production						
H	94.72 ^a	63.76	60.40 ^a	128.17	2.13	
A	90.14 ^b	63.77	57.47 ^b	127.10	2.22	
SEM	0.836	0.576	0.747	1.241	0.031	
Additive						
CON	90.94	63.82	58.05	128.14	2.22	
BS	93.29	63.40	59.13	126.94	2.15	
OEO	93.07	64.08	59.63	127.81	2.15	
SEM	1.024	0.706	0.915	1.520	0.039	
Egg production×Additive						
	CON	95.09 ^a	63.91	60.83	129.82 ^{ab}	2.14
H	BS	94.89 ^a	63.11	59.87	130.24 ^{ab}	2.18
	OEO	94.20 ^a	64.26	60.51	124.44 ^{ab}	2.06
	CON	86.80 ^b	63.72	55.27	126.47 ^{ab}	2.30
A	BS	91.69 ^a	63.69	58.40	123.64 ^b	2.12
	OEO	91.94 ^a	63.90	58.74	131.19 ^a	2.23
SEM		1.448	0.998	1.294	2.150	0.055
P-values						
Egg production	0.0007	0.9896	0.0105	0.5488	0.0528	
Additive	0.2225	0.7944	0.4707	0.8475	0.3227	
Interaction	0.0499	0.8824	0.2323	0.0129	0.0864	

n=30.

^{a,b} Means in same rows with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

H, high egg production; A, average egg production; CON, fed a basal diet; BS, fed basal diet plus 3×10^8 CFU/kg feed *Bacillus subtilis*; OEO, fed basal diet plus 0.3 g/kg feed oregano essential oil.

는 없었지만, 평균 산란율을 가진 산란계에서는 산란계의 생산성을 개선하기 위해 BS와 OEO의 급여가 긍정적인 효과를 보인 것으로 사료된다. 특히 산란율 향상은 산란말기 농가의 생산성을 향상시킬 수 있는 중요한 요소 중 하나로 간주될 수 있으며, 이러한 첨가물 급여는 계란의 효율적인 생산방법 중 하나로 사용될 수 있다.

2. 혈구 분석

산란말기 산란율 및 BS와 OEO 급여에 따른 혈구 변화에 대한 결과는 Table 2와 3에 나타내었다. 혈구 분석 결과, 모

든 지표에서 산란율 및 장건강 물질에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 상호작용 효과 또한 없었다. 백혈구, 적혈구, 혈소판 등 혈구는 육계의 스트레스나 면역 상태 등의 건강 상태를 파악하는데 중요하다고 알려져 있다(Tabeekh, 2016). 그 중 백혈구는 가금류와 같은 척추 동물에서 외부 침입 물질 및 자극으로부터 동물에게 면역작용을 하여 몸을 보호하는 작용한다(Chechik et al., 1986). 가금류에서 Heterophils(HE)과 Monocytes, Platelets이 식세포 작용을 하며, HE는 급성 염증 반응에서 감염성 및 비감염성 공격을 받은 조직에 처음으로 축적되는 식세포로 알려져 있다(Lentfer et

Table 2. Effect of dietary *Bacillus subtilis* and oregano essential oil supplementation in composition of leukocyte profile of late-phase laying hens

	WBC	HE	LY	HE/LY	MO	
Egg production						
H	14.04	2.13	11.09	0.18	1.44	
A	16.32	2.06	10.96	0.17	1.42	
SEM	0.939	0.260	0.621	0.014	0.119	
Additive						
CON	13.74	2.07	10.95	0.16	1.28	
BS	15.30	1.99	10.61	0.18	1.51	
OEO	16.50	2.22	11.53	0.19	1.51	
SEM	1.151	0.319	0.761	0.017	0.146	
Egg production×Additive						
	CON	11.1	1.67	10.05	0.15	1.22
H	BS	15.15	2.39	11.39	0.2	1.55
	OEO	15.86	2.32	11.85	0.19	1.55
	CON	16.38	2.47	11.86	0.18	1.34
A	BS	15.44	1.59	9.82	0.15	1.47
	OEO	17.15	2.13	11.21	0.18	1.46
SEM		1.672	0.451	1.076	0.024	0.206
<i>P</i> -values						
Egg production	0.0917	0.8587	0.8829	0.6760	0.9060	
Additive	0.2447	0.8712	0.6877	0.7066	0.4426	
Interaction	0.2771	0.2095	0.2779	0.2918	0.8462	

n=10.

WBC, white blood cells; HE, heterophils; LY, lymphocytes; HE/LY, heterophil/lymphocytes; MO, monocytes; RBC, red blood cells; Hb, hemoglobin; HCT, hematocrit; MCV, Mean corpuscular volume; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration.

H, high egg production; A, average egg production; CON, fed a basal diet; BS, fed basal diet plus 3×10^8 CFU/kg feed *Bacillus subtilis*; OEO, fed basal diet plus 0.3 g/kg feed oregano essential oil.

al., 2015). 또한 닭 등의 가금류가 스트레스를 받으면 Lymphocytes(LY)는 감소하고 HE가 증가한다고 알려져 있다. 또한, 현재까지 가금류의 스트레스 지표로 사용되고 있으며, HE/LY 비율이 낮으면 스트레스 수준이 낮음을 나타낸다 (Gross and Siegel, 1983). 하지만, 산란율과 장 건강 물질 급여로 산란 말기 혈구의 조성 변화에는 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다.

3. 혈청 생화학

산란말기 산란율 및 BS와 OEO 급여에 따른 혈청 생화학 분석 결과는 Table 4에 나타내었다. 산란말기 산란율 및 BS와 OEO 급여로 인하여 산란계의 혈청 내 Total cholesterol, Triglyceride, Glucose, Total protein, Aspartate aminotransferase(AST), Alanine aminotransferase(ALT), Ca, Creatinine, Albumin, Lactate dehydrogenase는 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 상호작용 효과 또한 없었다.

AST와 ALT는 간 활동에 영향을 미치는 질병이나 영양 결핍으로 인한 대사 작용의 지표로 사용된다(Arslan et al.,

Table 3. Effect of dietary *Bacillus subtilis* and oregano essential oil supplementation in composition of leukocyte, erythrocyte, and platelets profile of late-phase laying hens

	RBC	Hb	HCT	MCV	MCHC	PLT	
Egg production							
H	2.54	9.72	25.39	100.49	37.83	19.41	
A	2.66	10.10	26.37	100.28	37.35	18.56	
SEM	0.040	0.164	0.426	0.663	0.241	0.980	
Additive							
CON	2.61	10.05	26.01	100.42	37.87	20.39	
BS	2.60	9.92	25.71	100.59	37.66	19.56	
OEO	2.60	9.77	25.94	100.13	37.24	17.00	
SEM	0.049	0.201	0.522	0.812	0.295	1.200	
Egg production×Additive							
	CON	2.58	9.89	25.53	98.9	37.59	37.79
H	BS	2.55	9.74	25.73	101.51	38.4	37.96
	OEO	2.49	9.53	24.91	101.04	37.28	37.74
	CON	2.64	10.21	26.48	101.94	38.02	37.94
A	BS	2.64	10.09	25.68	99.68	36.89	37.36
	OEO	2.72	10	26.97	99.21	36.56	36.74
SEM		0.070	0.284	0.738	1.148	0.489	0.417
<i>P</i> -values							
Egg production	0.0309	0.1102	0.1097	0.8258	0.1615	0.5415	
Additive	0.9887	0.6114	0.9130	0.9191	0.3237	0.1257	
Interaction	0.4558	0.9633	0.3666	0.0587	0.3779	0.3945	

n=10.

WBC, white blood cells; HE, heterophils; LY, lymphocytes; HE/LY, heterophil/lymphocytes; MO, monocytes; RBC, red blood cells; Hb, hemoglobin; HCT, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration.

H, high egg production; A, average egg production; CON, fed a basal diet; BS, fed basal diet plus 3×10^8 CFU/kg feed *Bacillus subtilis*; OEO, fed basal diet plus 0.3 g/kg feed oregano essential oil.

2022). Gül et al.(2020)의 연구에서 38~40주령의 White Lohmann 산란계의 AST 농도는 8주간의 OEO 급여(200, 400, 600 mg/kg)로 인하여 유의적인 차이를 보이지 않았다고 보고하였다. Arslan et al.(2022)의 연구에서는 48주된 Hy-Line brown에 EO(50, 100, 200 mg/kg)을 84일 급여하였을 때 혈청 ALT의 변화는 없었다고 보고하였다. 골격근에서 phosphocreatine 분해의 부산물인 Creatinine은 단백질 대사 (Piotrowska et al., 2011) 및 신장 기능의 중요한 지표이다 (Marono et al., 2017). Arslan et al.(2022)의 연구에서 산란

후기(48주령) 산란계에서 EO(50, 100, 200 mg/kg)의 급여로 인하여 혈청 내 Creatinine의 변화가 없었으며, 수치는 0.39~0.45 mg/dL를 나타내어 본 연구와 유사한 수치를 나타내었다. 또한 Gül et al.(2020)에서도 38~40주령의 산란계에 8주간의 OEO의 급여로 인한 Creatinine 차이는 없었다고 보고하였다. Yu et al.(2020)의 연구에서는 1일령의 Lohmann Brown에게 0.1% BS를 63일 동안 급여하였을 때 혈청 내 Glucose, Total protein, Albumin가 첨가하지 않은 처리군과 유의적인 차이는 없었다고 보고하였다.

Table 4. Effect of dietary *Bacillus subtilis* and oregano essential oil supplementation in serum biochemical profiles of late-phase laying hens

	TC	TG	GLU	TP	AST	ALT	Ca	Crea	ALB	LDH
Egg production										
H	170.28	1,573.20	174.19	6.44	224.78	0.45	29.41	0.32	2.17	1,392.30
A	159.75	1,415.66	178.73	6.47	231.07	0.62	28.32	0.32	2.19	1,563.83
SEM	7.697	39.230	5.859	0.089	14.898	0.106	0.429	0.004	0.021	101.246
Additive										
CON	177.38	1,516.26	170.54	6.41	215.81	0.48	28.96	0.33	2.19	1,454.51
BS	151.44	1,532.10	170.16	6.41	242.44	0.65	28.52	0.32	2.16	1,591.60
OEO	166.23	1,434.93	188.67	6.56	225.53	0.47	29.11	0.32	2.19	1,388.09
SEM	9.427	48.047	7.175	0.109	18.246	0.130	0.526	0.005	0.026	124.000
Egg production×Additive										
CON	169.76	1,595.20	163.79	6.32	219.18	0.50	29.17	0.33	2.18	1,331.9
H BS	159.61	1,619.19	174.36	6.36	219.55	0.46	29.39	0.32	2.15	1,535.4
OEO	181.45	1,505.23	184.41	6.64	235.63	0.39	29.66	0.33	2.18	1,309.7
CON	185.00	1,437.33	177.30	6.50	212.45	0.45	28.75	0.33	2.20	1,577.1
A BS	143.26	1,445.01	165.95	6.45	265.33	0.85	27.65	0.32	2.18	1,647.8
OEO	151.00	1,364.64	192.93	6.48	215.43	0.55	28.57	0.32	2.20	1,466.5
SEM	13.332	67.948	10.147	0.155	25.804	0.184	0.743	0.007	0.036	175.36
<i>P</i> -values										
Egg production	0.3393	0.0069	0.5868	0.7854	0.7670	0.2721	0.0808	0.6136	0.4052	0.2377
Additive	0.1613	0.3181	0.1264	0.5468	0.5837	0.5299	0.7089	0.6593	0.6325	0.5021
Interaction	0.2263	0.9699	0.5318	0.5347	0.4094	0.4876	0.6770	0.4512	0.9915	0.9284

n=10.

^{a,b} Means in same rows with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

H, high egg production; A, average egg production; CON, fed a basal diet; BS, fed basal diet plus 3×10^8 CFU/kg feed *Bacillus subtilis*; OEO, fed basal diet plus 0.3 g/kg feed oregano essential oil.

혈청 내 Ca은 생체 이용률을 의미한다. Bozkurt et al. (2016)의 연구에서는 OEO의 급여로 혈청 내 Ca의 차이는 없었다고 보고하였으며, Arslan et al.(2022)의 60주 산란계 혈청 내 Ca 함량은 29.2~33.3 mg/dL 수치를 나타냈다고 보고하였으며, 본 연구와 유사하였다. 또한 Zou et al.(2021)의 연구에서 48주령의 산란계에 BS를 30일 및 60일 동안에 BS 급여로 혈청 내 Ca의 함량의 변화는 없었다고 보고하였다. 따라서 산란율과 BS와 OEO의 급여로 인한 혈청 생화학 지표에서는 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다.

4. 계란 품질

산란말기 BS 및 OEO 급여에 따른 계란 품질에 미치는 영향을 Table 5에 나타내었다. 난각두께, 난황색, 난백고, 계란신선도(Haugh unit), 난각 색도(L*, a*, b*)에서는 산란율 및 BS, OEO 첨가로 인한 유의적인 차이가 없었으며, 상호작용 효과도 없었다. 그러나 난각강도 결과, 산란율 차이에 따른 유의적인 차이는 없었으나, OEO 급여로 인하여 난각강도가 증가하였다. 일반적으로 계란 품질은 계란의 연령이 증가함에 따라 저하되는 것으로 알려져 있으며, 이것은 계

Table 5. Effect of dietary *Bacillus subtilis* and oregano essential oil supplementation on Egg quality of late-phase laying hens

	Eggshell strength (kg/cm ²)	Eggshell thickness (um)	Yolk color	Albumen height (mm)	Haugh unit	
Egg production						
H	3.11	0.40	6.37	6.97	82.19	
A	3.30	0.40	6.38	7.44	81.86	
SEM	0.057	0.003	0.084	0.468	0.542	
Additive						
CON	3.06 ^b	0.41	6.35	6.99	81.72	
BS	3.15 ^b	0.41	6.40	7.79	81.85	
OEO	3.38 ^a	0.40	6.37	6.85	82.50	
SEM	0.070	0.004	0.103	0.575	0.661	
Egg production×Additive						
	CON	2.96	0.41	6.33	7.25	83.31
H	BS	3.07	0.40	6.37	6.69	80.90
	OEO	3.31	0.40	6.40	6.97	82.36
	CON	3.17	0.40	6.37	6.72	80.13
A	BS	3.23	0.42	6.44	8.89	82.81
	OEO	3.49	0.40	6.33	6.72	82.65
SEM		0.098	0.006	0.147	0.807	0.935
P-values						
Egg production		0.0501	0.7970	0.9213	0.4755	0.6699
Additive		0.0045	0.1880	0.9383	0.4587	0.6700
Interaction		0.9327	0.3406	0.8898	0.1821	0.0510

n=30.

^{a-c} Means in same rows with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

H, high egg production; A, average egg production; CON, fed a basal diet; BS, fed basal diet plus 3×10^8 CFU/kg feed *Bacillus subtilis*; OEO, fed basal diet plus 0.3 g/kg feed Oregano essential oil.

란의 내부 및 외부에 모두 영향을 미친다(Bozkurt, et al., 2016). 또한 산란 말기가 될수록 산란계의 Ca이 부족해져 껍질이 벗겨지고, 깨지는 알의 수가 증가한다. 이는 Ca의 흡수 감소와 스트레스 등의 문제로 인한 것으로 알려져 있다 (Alfonso-Carrillo et al., 2021). Zou et al.(2021)은 48주령 산란계에게 BS(0.5 g/kg)를 60일 동안 급여하였을 때 계란 품질에는 영향을 미치지 않았다고 보고하였다. Çufadar(2018)은 24주령 산란계에게 rosemary essential oil 0.25 g/kg을 12주 동안 급여하였 때 난각강도가 증가하였다고 보고하였다. EO는 산란계의 장 내 유익한 미생물 군집의 대사활동에 영

향을 미쳐 Ca, Mg 등의 미네랄 흡수에 긍정적인 영향을 주어 난각 품질에 영향을 미친 것으로 사료된다(Ghanima et al., 2020). Forte et al.(2016)의 연구에서는 16주령 산란계에게 20주 동안 BS를 사료 첨가물로 급여하였을 때 계란의 Haugh unit, 난각색(L*, a*, b*)의 유의적인 차이를 가져 오지 않았다고 보고하였다. Yörük et al.(2004)의 연구에서는 산란후기(54주령)의 산란계에게 생균제(0.1%)를 75일간 급여시켰을 때 계란의 품질에는 영향을 미치지 않았다고 보고하였다. 따라서 이러한 결과는 OEO 급여는 산란말기 산란계의 난각 강도에 영향을 미친다는 것을 의미하며, 산란말

기 지속적인 상품성 있는 계란의 생산을 위한 좋은 첨가제로 사용이 가능할 것으로 사료된다.

5. 회장 내 용모의 조직학적 특성

산란말기 산란율 및 BS와 OEO 급여에 따른 산란계 회장 내 용모의 조직학적 변화를 Fig. 1에 나타내었으며, 이를 바탕으로 용모와 장샘을 대상으로 장 건강 지표인 용모높이 (villi height; VH)와 장샘깊이(crypt depth: CD)에 대한 분석 결과를 Table 6에 나타내었다. 소장은 영양소의 소화 및 흡수에 중요한 기관이며, 흡수 효율은 특히 소장 용모의 조직 형태에 달라진다(Awad et al., 2008). 특히 산란 후기가 지날수록 영양분 섭취 등의 장내 소화 흡수 작용이 점차 감소하며(Abe et al., 1982), 이는 흡수 표면을 감소시켜 장 상피 구조의 변화로 인한 문제로도 인식된다(Ren, et al., 2014). VH는 용모의 표면적을 넓혀 소장의 소화 및 흡수와 상관관계가 있다고 알려져 있으며(Arslan et al., 2022), 건강한 소화관을 가진 산란계는 CD는 낮고 길고 정상적인 용모가 있다(Ferket et al., 2002). VH는 산란율에 따른 차이는 없었으나, CON보다 BS처리구에서 유의적으로 높은 값을 나타내었으며($P<0.05$), 산란율과 장건강 물질 급여의 상호작용 효과도 나타내었다. CD의 결과에서는 산란율에 따른 유의적인 차이를 보였으며($P<0.05$), 장건강 물질(BS 및 OEO) 급여로 인

하여 CD값이 낮아졌다. 또한 CD는 산란율과 장건강물질에 따른 유의적인 상호작용 효과도 나타내었다($P<0.05$). 용모의 길이를 판단할 수 있는 VH/CD의 비율을 측정하였을 때, 산란율이 높을수록 유의적으로 낮은 값을 나타내었다. 또한 CON보다 BS와 OEO의 급여로 VH/CD가 유의적으로 증가하였으며, 산란율과 장건강 물질 첨가에 따른 상호작용 효과도 나타내었다($P<0.05$).

Gül et al.(2020)은 38~40주령의 White Lohmann 산란계에 8주간 OEO 급여(200, 400, 600 mg/kg)하였으며, Arslan et al.(2022)은 48주령의 Hy-Line brown에 EO를 50, 100, 200 mg/kg의 농도로 하여 12주간 급여하였다. 두 연구 결과, OEO의 급여로 VH가 증가하였다고 보고하였다. Gao et al.(2019)은 essential oil과 유기산을 사료 첨가물로 급여한 21주령 육계의 CD가 감소하였으며, 그에 따라 VH/CD가 증가하였다고 보고하였다. Chen et al.(2020)의 연구에서는 29주령의 산란계에게 BS(5×10^8 cfu BS/kg)를 10주 동안 급여하였을 때, VH/CD의 비율의 비율이 증가하였고, BS의 첨가가 장 조직학적으로 개선하는 메커니즘은 항생제와 유사한 기능으로 병원성 미생물 및 독소로부터 보호하고, 장내 미생물의 균집을 변화인 것으로 사료된다고 보고하였다(Xing et al., 2015). OEO 또한 병원성 미생물의 활성을 억제하는 항균제 역할에 대한 효과로 장 조직학적 차이를 가지고 온

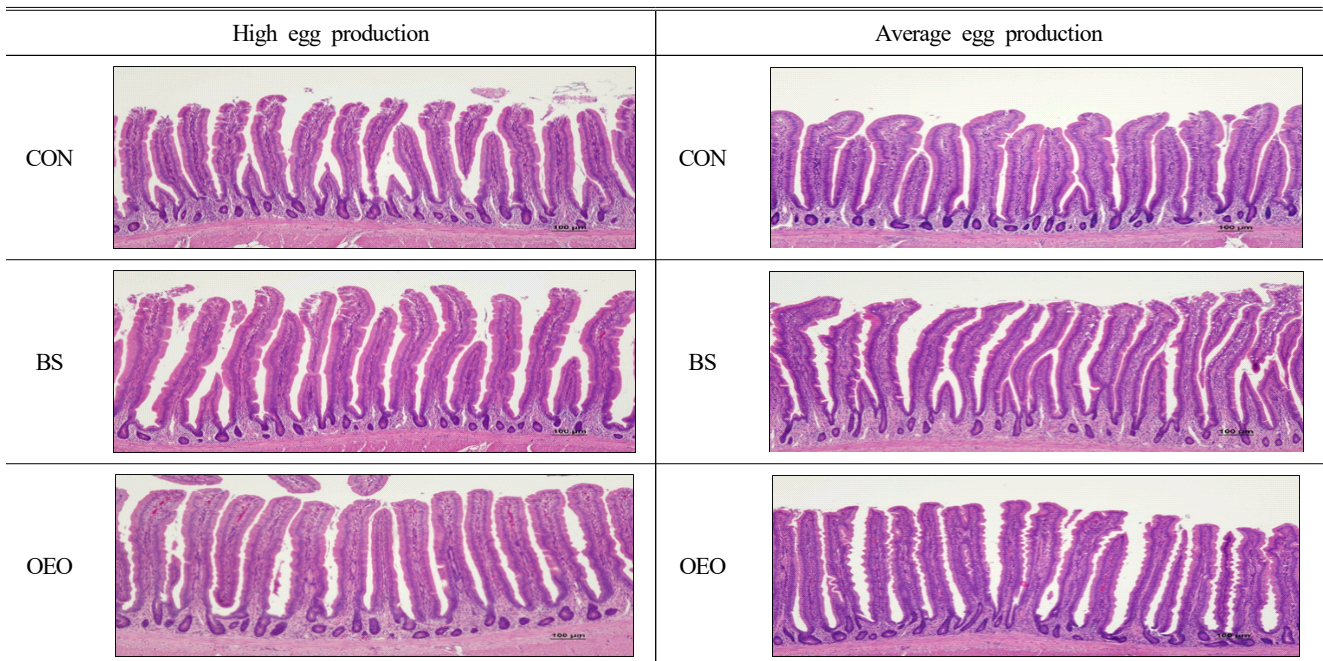


Fig. 1. Effect of dietary *Bacillus subtilis* and oregano essential oil supplementation on intestinal morphology (H&E stain) of late-phase laying hens (74 weeks). n=6. CON, fed a basal diet; BS, fed basal diet plus 3×10^8 CFU/kg feed *Bacillus subtilis*; OEO, fed basal diet plus 0.3 g/kg feed oregano essential oil.

Table 6. Effect of dietary *Bacillus subtilis* and oregano essential oil supplementation on intestinal morphology(H&E stain) of late-phase laying hens

		Villi height (μm)	Crypt depth (μm)	Villi height / Crypt depth
Egg production				
	H	592.80	103.13 ^a	5.85 ^b
	A	610.76	99.06 ^b	6.22 ^a
	SEM	8.501	1.402	0.078
Additive				
	CON	584.23 ^b	111.55 ^a	5.27 ^b
	BS	622.20 ^a	98.59 ^b	6.37 ^a
	OEO	598.89 ^{ab}	93.15 ^c	6.45 ^a
	SEM	10.412	1.717	0.096
Egg production×Additive				
	CON	587.90 ^{bc}	117.87 ^a	5.00 ^c
H	BS	631.38 ^a	101.53 ^{bc}	6.28 ^a
	OEO	559.11 ^c	89.99 ^d	6.26 ^a
	CON	580.57 ^{bc}	105.23 ^b	5.54 ^b
A	BS	613.02 ^{ab}	95.64 ^{cd}	6.47 ^a
	OEO	638.67 ^a	96.32 ^{cd}	6.64 ^a
	SEM			
<i>P</i> -values				
	Egg production	0.1375	0.042	0.0011
	Additive	0.0368	<.0001	<.0001
	Interaction	0.0018	0.0006	0.4553

n=6.

^{a-d} Means in same rows with different superscripts are significantly different (*P*<0.05).

H, high egg production; A, average egg production; CON, fed a basal diet; BS, fed basal diet plus 3×10^8 CFU/kg feed *Bacillus subtilis*; OEO, fed basal diet plus 0.3 g/kg feed oregano essential oil.

것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 생균제인 *Bacillus subtilis*(BS) 및 Oregano essential oil(OEO)이 산란말기 산란계의 계란 생산성, 계란 품질, 그리고 회장 내 용모의 조직학적 특성에 미치는 영향을 조사하였다. 산란말기(69주령) 산란계 총 150마리를 공시하였으며, 시험 전 산란율 차이에 따라 산란율 100%(H), 평균(A, 88%~89%) 총 두 그룹으로 나눈 다음, 각 그룹별로 BS

또는 OEO를 처리하였다. 산란율 차이에 따른 두 그룹에서 각각 대조군(CON)은 상업용 시판사료를 급여하였으며, BS군은 대조군 사료에 3×10^8 CFU/kg *Bacillus subtilis*를 첨가하였고, OEO는 대조군 사료에 사료용 Oregano essential oil 0.3 g/kg을 첨가하였다. 총 6처리로 하여 처리당 5반복, 반복당 5수를 완전 임의 배치하여 5주간 사양 시험을 수행하였다. 시험 종료 후 계란 생산성, 계란 품질, 그리고 회장 내 용모의 조직학적 특성을 조사하였다. 산란율 평균인 처리구에서 BS(91.69%) 및 OEO(91.94%)에서 CON(86.80%)과 비교하여 유의적으로 증가하였다. 혈구 및 혈청 생화학 분석

결과, 산란말기 산란율 및 BS과 OEO 첨가 급여에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 난각강도는 OEO(3.31~3.49 kg/cm²)에서 CON(2.96~3.17 kg/cm²)과 비교하여 유의적으로 개선되었다($P<0.05$). 장 건강지표인 융모높이(villi height; VH)와 장샘깊이(crypt depth: CD)에 대한 분석결과, CON보다 BS와 OEO를 급여한 처리구에서 높은 VH/CD의 비율을 나타내었다($P<0.05$). 본 연구 결과는 산란말기 산란계 사료에 *Bacillus subtilis*와 Oregano essential oil을 첨가 급여하는 것이 산란율, 계란품질 및 장 건강을 향상시키는 사료 첨가제로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

(색인어 : 산란계, 생균제, 에센셜 오일, 생산성, 장 건강)

사 사

본 연구는 2023년 농촌진흥청 국립축산과학원 축산시험 연구사업(과제번호: PJ015693)과 전문연구원 과정 지원사업에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

ORCID

Hyunsoo Kim <https://orcid.org/0000-0001-8887-1318>
 Hee-Jin Kim <https://orcid.org/0000-0002-6959-9790>
 Yeon-Seo Yun <https://orcid.org/0000-0001-6950-0415>
 Woo-Do Lee <https://orcid.org/0000-0003-4861-4637>
 Hyekyoung Shin <https://orcid.org/009-0003-0984-6811>
 Jiseon Son <https://orcid.org/0000-0002-5285-8186>
 Eui-Chul Hong <https://orcid.org/0000-0003-1982-2023>
 Ik Soo Jeon <https://orcid.org/0000-0002-5898-7050>
 Hwan-Ku Kang <https://orcid.org/0000-0002-4286-3141>

REFERENCES

- Abe E, Horikawa H, Masumura T, Sugahara M, Kubota M, Suda T 1982 Disorders of cholecalciferol metabolism in old egg-laying hens. *The J Nutr* 112(3): 436-446.
- Alfonso-Carrillo C, Benavides-Reyes C, de Los Mozos J, Dominguez-Gasca N, Sanchez-Rodríguez E, Garcia-Ruiz AI, Rodriguez-Navarro AB 2021 Relationship between bone quality, egg production and eggshell quality in laying hens at the end of an extended production cycle (105 weeks). *Animals* 11(3):623.
- Arslan C, Pirinç A, Eker N, Sur E, Ündağ İ, Kuşat T 2022 Dietary encapsulated essential oil mixture influence on apparent nutrient digestibility, serum metabolic profile, lymphocyte histochemistry and intestinal morphology of laying hens. *Anim Biosci* 35(5):740.
- Awad WA, Ghareeb K, Nitsch S, Pasteiner S, Abdel-Raheem S, Böhm J 2008 Effects of dietary inclusion of prebiotic, probiotic and synbiotic on the intestinal glucose absorption of broiler chickens. *Int J Poult Sci* 7(7):688-691.
- Bozkurt M, Bintaş E, Kırkan Ş, Akşit H, Küçükylmaz K, Erbaş G, Çabuk M, Akşit D, Parın U, Ege G, Koçer B, Seyrek K, Tüzün AE 2016 Comparative evaluation of dietary supplementation with mannan oligosaccharide and oregano essential oil in forced molted and fully fed laying hens between 82 and 106 weeks of age. *Poult Sci* 95(11):2576-2591.
- Chechik BE, Sengupta S, Fernandes B 1986 Novel heterophile chicken antigen: immunohistochemical localization using antisera to *Mycobacterium smegmatis* and possible association with lymphocyte maturation. *Histochem J* 18(1):36-40.
- Chen JF, Xu MM, Kang KL, Tang SG, He CQ, Qu XY, Guo SC 2020 The effects and combinational effects of *Bacillus subtilis* and montmorillonite on the intestinal health status in laying hens. *Poult Sci* 99(3):1311-1319.
- Çufadar Y 2018 Effects of dietary different levels of rosemary essential oil on performance and eggshell quality parameters in laying hens. *Selcuk J Agr and Food Sci* 32(3):454-457.
- Deng W, Dong XF, Tong JM, Zhang Q 2012 The probiotic *Bacillus licheniformis* ameliorates heat stress-induced impairment of egg production, gut morphology, and intestinal mucosal immunity in laying hens. *Poult Sci* 91(3):575-582.
- Feng J, Lu M, Wang J, Zhang H, Qiu K, Qi G, Wu S 2021 Dietary oregano essential oil supplementation improves intestinal functions and alters gut microbiota in late-phase laying hens. *J Anim Sci Biotechnol* 12(1):1-15.
- Ferket PR, Parks CW, Grimes JL (2002) Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. Page 1-22 In: Multi-State Poultry Meeting. Illinois, USA.
- Forte C, Moscati L, Acuti G, Mugnai C, Franciosini MP,

- Costarelli S, Cobellis M, Trabalza Marinucci M 2016 Effects of dietary *Lactobacillus acidophilus* and *Bacillus subtilis* on laying performance, egg quality, blood biochemistry and immune response of organic laying hens. *J Anim Physiol Anim Nutr* 100(5):977-987.
- Gao YY, Zhang XL, Xu LH, Peng H, Wang CK, Bi YZ 2019 Encapsulated blends of essential oils and organic acids improved performance, intestinal morphology, cecal microflora, and jejunal enzyme activity of broilers. *Czech J Anim Sci* 64(5):189-198.
- Gao Z, Wu H, Shi L, Zhang X, Sheng R, Yin F, Gooneratne R 2017 Study of *Bacillus subtilis* on growth performance, nutrition metabolism and intestinal microflora of 1 to 42 d broiler chickens. *Anim Nutr* 3(2):109-113.
- Ghanima MMA, Alagawany M, Abd El-Hack ME, Taha A, Elnesr SS, Ajarem J, Allam AA, Mahmoud AM 2020 Consequences of various housing systems and dietary supplementation of thymol, carvacrol, and euganol on performance, egg quality, blood chemistry, and antioxidant parameters. *Poult Sci* 99(9):4384-4397.
- Gül M, Yilmaz E, Sezmiş G, Apaydin Yildirim B, Kaya A, Önel S 2020 Effect of oregano (*Oreganum syriacum* L.) essential oil and cage density on performance parameters, egg quality criteria, some blood biochemical parameters, blood antioxidant capacity, and intestinal histopathology in laying hens. *GSC Biol Pharm Sci* 13(2): 136-145.
- Hahn-Didde D, Purdum SE 2016 Probiotics and prebiotics used alone or in combination and effects on pullet growth and intestinal microbiology. *J Appl Poult Res* 25(1):1-11.
- Ibrahim D, Ismail TA, Khalifa E, Abd El-Kader SA, Mohamed DI, Mohamed DT, Shahin SE, Abd El-Hamid MI 2021 Supplementing garlic nanohydrogel optimized growth, gastrointestinal integrity and economics and ameliorated necrotic enteritis in broiler chickens using a *Clostridium perfringens* challenge model. *Animals* 11(7): 2027.
- Jing M, Munyaka PM, Tactacan GB, Rodriguez-Lecompte JC, House JD 2014 Performance, serum biochemical responses, and gene expression of intestinal folate transporters of young and older laying hens in response to dietary folic acid supplementation and challenge with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Poult Sci* 93(1):122-131.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ 2001 A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* 91(3):453-462.
- Lentfer TL, Pendl H, Gebhardt-Henrich SG, Fröhlich EKF, Von Borell E 2015 H/L ratio as a measurement of stress in laying hens - methodology and reliability. *Br Poult Sci* 56(2):157-163.
- Li W, Bai J, Li Y, Qin Y, Yu D 2014 Effects of *Bacillus subtilis* on meat quality, nutrient digestibility and serum biochemical parameters of broilers. *Chinese J Vet Sci* 34 (10):1682-1685.
- Marono S, Loponte R, Lombardi P, Vassalotti G, Pero ME, Russo F, Gasco L, Parisi G, Piccolo G, Nizza S, Di Meo C, Attia YA, Bovera F 2017 Productive performance and blood profiles of laying hens fed *Hermetia illucens* larvae meal as total replacement of soybean meal from 24 to 45 weeks of age. *Poult Sci* 96(6):1783-1790.
- Meligy AM, Abd El-Hamid MI, Yonis AE, Elhaddad GY, Abdel-Raheem SM, El-Ghareeb W R, Mohamed MHA, Ismail H., Ibrahim D 2023 Liposomal encapsulated oregano, cinnamon, and clove oils enhanced the performance, bacterial metabolites antioxidant potential, and intestinal microbiota of broiler chickens. *Poult Sci* 102(6):102683.
- Piotrowska A, Burlikowska K, Szymeczko R 2011 Changes in blood chemistry in broiler chickens during the fattening period. *Folia Biol (Krakow)* 59(3-4):183-187.
- Rattanawut J, Pimpa O, Yamauchi KE 2018 Effects of dietary bamboo vinegar supplementation on performance, eggshell quality, ileal microflora composition, and intestinal villus morphology of laying hens in the late phase of production. *Anim Sci J* 89(11): 1572-1580.
- Ren WY, Wu KF, Li X, Luo M, Liu HC, Zhang SC, Hu Y 2014 Age-related changes in small intestinal mucosa epithelium architecture and epithelial tight junction in rat models. *Aging Clin Exp Res* 26:183-191.
- Sovran B, Hugenholtz F, Elderman M, Van Beek AA, Graversen K, Huijskes M, Boeschoten MV, Savekoul HFJ, Dekker J, Wells JM 2019 Age-associated impairment of the mucus barrier function is associated with profound

- changes in microbiota and immunity. *Sci Rep* 9(1):1437.
- Tabeeekh MAA 2016 An investigation on the effect of light color and stocking density on some blood parameters of broilers and layers. *Donnish J Agri Res* 3(2):8-12.
- Van Den Brand H, Parmentier HK, Kemp AB 2004 Effects of housing system (outdoor vs cages) and age of laying hens on egg characteristics. *Br Poult Sci* 45(6):745-752.
- Wang WW, Wang J, Zhang HJ, Wu SG, Qi GH 2019 Transcriptome analysis reveals mechanism underlying the differential intestinal functionality of laying hens in the late phase and peak phase of production. *BMC Genom* 20: 1-14.
- Wang WW, Wang J, Zhang HJ, Wu SG, Qi GH 2020 Effects of *Clostridium butyricum* on production performance and intestinal absorption function of laying hens in the late phase of production. *Anim Feed Sci Technol* 264:114476.
- Xing Y, Wang S, Fan J, Oso AO, Kim SW, Xiao D, Yang T, Liu G, Jiang G, Li Z, Li L, Zhang B 2015 Effects of dietary supplementation with lysine-yielding *Bacillus subtilis* on gut morphology, cecal microflora, and intestinal immune response of Linwu ducks. *J Anim Sci* 93(7):3449-3457.
- Yörük MA, Gül M, Hayirli A, Macit M 2004 The effects of supplementation of humate and probiotic on egg production and quality parameters during the late laying period in hens. *Poult Sci* 83(1):84-88.
- Yu W, Hao X, Zhiyue W, Haiming Y, Lei X 2020 Evaluation of the Effect of *Bacillus subtilis* and *Pediococcus acidilactici* mix on serum biochemistry, growth promotion of body and visceral organs in Lohmann brown chicks. *Braz J Poult Sci* 22(3):1-8.
- Zeng Z, Zhang S, Wang H, Piao X 2015 Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. *J Anim Sci Biotechnol* 6(1):1-10.
- Zou X, Jiang S, Zhang M, Hu H, Wu X, Liu J, Jin M, Cheng H 2021 Effects of *Bacillus subtilis* on production performance, bone physiological property, and hematology indexes in laying hens. *Animals* 11(7):2041.

Received Nov. 28, 2023, Revised Dec. 18, 2023, Accepted Dec. 27, 2023