

## THE EFFECT OF THE PROBIOTICS *Bacillus subtilis* (PB6) ON THE SELECTED INDICATORS OF THE TABLE EGGS QUALITY, FAT AND CHOLESTEROL

Mária Angelovičová, Ebrahim Alfaig, Martin Král, Jana Tkáčová

### ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of dietary probiotics *Bacillus subtilis* (PB6) on egg weigh, egg mass weigh, egg fat content and cholesterol content in egg yolk in laying hens ISA Brown during two experiments. The probiotics were supplied to the laying hens for 42 days as preparation period before eggs samples collection. The eggs samples were collected during 6 days for the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> experiments after the hens reached the age of 34 and 61 weeks, respectively. A total of 36 ISA Brown laying hens were divided into 2 treatment groups. Control group laying hens were fed a basal diet with no probiotic added. In group *Bacillus subtilis*, the basal diet was supplemented with the bacteria *Bacillus subtilis* (PB6) at 1 g/kg, min.  $2.3 \cdot 10^8$  cfu/g. Dietary treatments did not significantly affect the egg weigh, internal egg content weigh, cholesterol content expressed by g/100 g of egg yolk. *Bacillus subtilis* (PB6) supplementation significantly ( $p < 0.05$ ) increased the fat content in the internal egg content and cholesterol content in egg yolk expressed as g/pc.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*; krmivo; vajce; žltok; hmotnosť; tuk; cholesterol

### ÚVOD

Doplňky do krmiva sú cieleňé pre zvieratá určené na produkciu potravín. Jednou z možností je použitie probiotických doplnkov. V súčasnom období sú známe mnohé poznatky o ich účinkoch. Ich priame použitie do krmiva stimuluje chuťové vlastnosti krmiva (Nahashon et al., 1992; Nahashon et al., 1993), zlepšuje črevnú mikrobiálnu rovnováhu (Fuller, 1989), pomáha syntetizovať vitamíny (Coates a Fuller, 1977), stimuluje imunitný systém (Toms a Powrie, 2001), produkciu tráviacich enzýmov (Gilliland a Kim, 1984; Saarela et al., 2000), využívanie nestráviteľných sacharidov (Prins, 1977), podporuje produkciu kyseliny mliečnej a prchavých mastných kyselín (Bailey, 1987). Probiotické doplnky na báze účinnej látky v črevnom trakte produkujú toxické zlúčeniny ako prchavé mastné kyseliny, znižujú pH a uvoľňujú bakteriocíny (Rolf, 2000), aby mohli konkurovať iným mikroorganizmom v osídľovaní miesta (Dunham et al., 1993). Podobné stanovisko uvádzajú Kačániová et al. (2005). Podľa nich mechanizmus účinku probiotík spočíva v produkcii antibakteriálnych látok, čím inhibujú rast patogénov v kompetícii o adhezívne receptory na črevnom epiteli a v stimulácii imunity. Preto pri výbere probiotík zohráva významnú úlohu ich vysoká afinita k upevneniu na slizničnú stenu čreva a prispôsobovanie sa imunitným reakciám (Patterson a Burkholder, 2003). Ďalej je to podpora tráviacich enzýmov, stimulácia syntézy vitamínov skupiny B a posilnenie rastu nepatogénnych, fakultatívnych, anaeróbných a gram-pozitívnych baktérií, pretože produkujú inhibičné látky, ako sú prchavé mastné kyseliny a peroxid vodíka, ktoré inhibujú rast škodlivých baktérií, a tým sa zvyšuje odolnosť hostiteľa voči črevným

patogénom (Fuller, 1989; Jin et al., 1996; Rolf, 2000; Sun, 2005). Vo vzťahu ku zdravotnej bezpečnosti probiotická suplementácia môže znížiť obsah cholesterolu v krvi a vajcovom žltku (Mohan et al., 1995; Abdulrahim et al., 1996; Haddadin et al., 1996; Jin et al., 1998). Priaznivo ovplyvňujú obsah cholesterolu v krvnom sére a celkové lipidy počas znáškového cyklu sliepok (Capcarová et al., 2010). Pozornosť sa venuje najmä baktériám mliečneho kvasenia, bifidobaktériám a bacilom. Laktacidoprodukčné baktérie majú špecifickú schopnosť prednostne kolonizovať určité oblasti gastrointestinálneho traktu hydiny. Bola preukázaná výrazná adhérenca týchto baktérií na výstelke hrvoľa, distálnej časti tenkého čreva a na cekálnej mukóze (Kačániová et al., 2011). V mnohých aktuálnych literárnych zdrojoch sa vyskytujú kontroverzné výsledky z výskumu používania probiotických doplnkov pri produkcii konzumných vajec. Preto je vhodné uviesť v metodike ich účinnú zložku, charakteristiku, formu použitia, dávku, aktivitu a iné. Dôvody nejednotných výsledkov variabilných účinkov probiotík u hydiny môžu byť pripisované zmenám črevnej mikroflóry a podmienkam chovného prostredia (Mahdavi et al., 2005), schopnosť alebo neschopnosť probiotík kolonizácie v tráviacom trakte a konkurenčne vylúčiť patogénne baktérie (Jin et al., 1997), ale aj intenzita stresu v chove (Lyon, 1987). Cieľom nášho článku je poskytnúť výsledky z experimentov, v ktorých bol použitý kŕmny probiotický doplnok na báze *Bacillus subtilis* (PB6) u znáškového typu sliepok ISA Brown, o jeho účinku na hmotnosť vajec, vnútorného obsahu vajec, žltka, obsah tuku vo vajcovom obsahu a obsah cholesterolu vo vajcovom žltku.

## MATERIÁL A METÓDY

### Predmet výskumu

Pre splnenie stanoveného cieľa boli uskutočnené dva bilančné pokusy s nosivým typom sliepok ISA Brown v pokusnom zariadení Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, č. SK P 10011. Bilančné pokusy v trvaní 6 dní nadväzovali na prípravné obdobie v trvaní 42 dní. Prvý bilančný pokus bol realizovaný počas prvej fázy znášky vo veku nosníc 34 týždňov s celkovým počtom zvierat 36 ks a druhý bilančný pokus bol počas druhej fázy znášky vo veku nosníc 61 týždňov s celkovým počtom zvierat 36 ks. Počas prípravného obdobia nosnice boli adaptované na experimentálne podmienky. Na kŕmenie bola použitá štandardná kŕmna zmes v práškovej forme, ktorá bola v pokusnej skupine označenej ako *Bacillus subtilis* obohatená probiotickým doplnkom na báze kmeňa baktérií *Bacillus subtilis* (PB6) v dávke 1 g.kg<sup>-1</sup>, min. 2,3.10<sup>8</sup> KTJ.g<sup>-1</sup>. Baktérie *Bacillus subtilis* sú dobre adaptabilné, schopné rastu v rozličnom prostredí vrátane pôdy, koreňov rastlín a gastrointestinálneho traktu zvierat (Earl et al., 2007). Na porovnanie výsledkov bola vytvorená kontrolná skupina, v ktorej bola použitá štandardná kŕmna zmes bez probiotika. Pri realizácii pokusov boli uplatnené princípy welfare.

### Odber vzoriek a analytický postup

Odber vajec na analýzu cholesterolu bol uskutočnený v prvý a posledný deň bilančného pokusu.

Hmotnosť vajec - váhy typu Kern-49N s presnosťou d=0,1 g.

Hmotnosť vajcového žĺtka - váhy typu Kern-49N s presnosťou d=0,1 g.

Sušina - vysušovanie vzorky za predpísaných podmienok v sušiarňi, typ J. R. Selecta s. a., pri teplote 105 °C.

vo vajcovom obsahu - vysušená vzorka vajcového obsahu s morským pieskom bola kvantitatívne premiestnená do extrakčného prístroja, typ DET-GRAS N, kde bola extrahovaná extrakčným činidlom petroléterom. Po extrakcii bola vzorka odparovaná na zvyšky petroléteru a sušená v sušiarňi pri teplote 100 °C.

Cholesterol vo vajcovom žĺtku - ručne oddelený vajcový žĺtok bol zhomogenizovaný v laboratórnom mixéri. Z homogenizovanej vzorky bolo navážené 5 g. Ku vzorke bolo pipetou pridané štvornásobné množstvo fyziologického roztoku 18,5 g NaCl (1 liter H<sub>2</sub>O). Zmes bola dôkladne zhomogenizovaná. Obsah cholesterolu bol stanovený podľa Ingra a Simeonovej (1983).

### Štatistická analýza

Prvotné údaje boli štatisticky spracované pomocou analýzy rozptylu (ANOVA) v programovom systéme SAS (SAS, 1985). Rozdiely boli testované pomocou F-testu a nasledného Scheffeho testu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

### Hmotnosť vajec

Na základe analýzy odvážených vajec sme zistili, že probiotikum na báze *Bacillus subtilis* (PB6) svojimi účinkami tendenčne zvýšilo ich hmotnosť v porovnaní s hmotnosťou vajec kontrolnej skupiny, pričom rozdiely neboli štatisticky významné (P>0,05). Podobné výsledky tendenčného zvýšenia hmotnosti vajec vplyvom probiotického doplnku zaznamenali Galazzi et al. (2008), Arpášová et al. (2012). Arpášová et al. (2012) do krmiva pre nosnice použili probiotický doplnok v dávke 0,5 g.kg<sup>-1</sup>, ktorý obsahoval lyofilizované druhy baktérií *Lactis* LAT 182, *Lactobacillus acidophilus* LAT 180, *Lactobacillus bulgaricus* LAT 187, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Lactobacillus helveticus* LAT 179, *Enterococcus faecium* E-253, *Streptococcus thermophilus* LAT 205, KTJ LAB: min. 5.10<sup>9</sup>.g<sup>-1</sup>. Na rozdiel od týchto výsledkov štatisticky významné zvýšenie hmotnosti vajec vplyvom laktobacilov v porovnaní s hmotnosťou vajec kontrolnej skupiny uvádzajú vo svojej štúdií Ramasamy et al. (2009).

### Hmotnosť vnútorného vajcového obsahu

Vplyvom probiotického doplnku *Bacillus subtilis* (PB6) sa hmotnosť vnútorného vajcového obsahu tendenčne zvýšila v porovnaní s hmotnosťou vnútorného vajcového obsahu kontrolnej skupiny. Hodnota tohto ukazovateľa úzko súvisí s hmotnosťou vajca.

### Obsah tuku vo vajcovom obsahu

Výsledky štatistického spracovania analýzovaných vzoriek obsahu tuku jednoznačne potvrdili štatisticky významne P<0,05 jeho zvýšenie vo vajcovom obsahu vplyvom probiotika na báze *Bacillus subtilis* (PB6). V literárnych zdrojoch je nedostatok poznatkov o vplyve probiotík na obsah celkového tuku vo vajci. Mikulski et al. (2012) skúmali vplyv probiotika na báze *Pediococcus acidilactici* MA 18/5M 100 mg.kg<sup>-1</sup> krmiva a po 12 týždňoch pridali do krmiva ďalších 50 mg.kg<sup>-1</sup>, na obsah celkových polynenasýtených mastných kyselín vrátane kyseliny linolovej a linolénovej kyseliny. Zistili významné zvýšenie (o 6,5 %) v porovnaní s výsledkami skupiny, v ktorej bolo krmivo obohatené o probiotikum 100 mg.kg<sup>-1</sup>, resp. kontrolnej skupiny bez probiotika.

### Hmotnosť vajcového žĺtka

Naše výsledky hmotnosti vajcového žĺtka získané v bilančných pokusoch, v ktorých sme sledovali vplyv probiotického doplnku na báze *Bacillus subtilis* (PB6) potvrdili závery vplyvu probiotík na hmotnosť žĺtka autorov Asli et al. (2007), Yalcin et al. (2002), ktorí tiež nezistili štatisticky významné rozdiely medzi skupinou s probiotickým doplnkom a kontrolnou skupinou. Podobné výsledky hmotnosti vajcového žĺtka bez štatistického potvrdenia rozdielov medzi skupinami dosiahli vo svojich experimentoch aj Kurtoglu et al. (2004). Sledovali vplyv komerčných kŕmnych probiotík (BioPlus 2B) v dávkach 0,25, 0,5 a 0,75 g.kg<sup>-1</sup> po dobu 90 dní.

**Tabuľka 1** Hmotnosť vajec, g

Vek nosníc, týždne	Skupina	n	$\bar{x}$	s	$V_k$
34	Kontrolná	31	59,33	4,71	7,94
	<i>Bacillus subtilis</i>	31	59,87	4,59	7,67
61	Kontrolná	20	66,26	5,70	8,60
	<i>Bacillus subtilis</i>	20	68,98	5,32	7,71
F-test	P>0,05				

Scheffeho test = P>0,05

**Tabuľka 2** Hmotnosť vnútorného vajcového obsahu, g

Vek nosníc, týždne	Skupina	n	$\bar{x}$	s	$V_k$
34	Kontrolná	31	50,52	4,73	9,36
	<i>Bacillus subtilis</i>	31	52,22	4,61	8,83
61	Kontrolná	20	57,33	5,72	10,00
	<i>Bacillus subtilis</i>	20	60,66	5,34	8,80
F-test	P>0,05				

Scheffeho test = P>0,05

**Tabuľka 3** Obsah cholesterolu vo vajcovom žĺtku

Vek nosníc, týždne	Skupina	n	Cholesterol g.100 g <sup>-1</sup>		Cholesterol g.ks <sup>-1</sup>	
			$\bar{x}$	Scheffeho test	$\bar{x}$	Scheffeho test
34	Kontrolná	31	1,48	P>0,05	0,220	P<0,05
	<i>Bacillus subtilis</i>	31	1,31		0,199	
61	Kontrolná	20	1,53	P>0,05	0,289	P<0,05
	<i>Bacillus subtilis</i>	20	1,41		0,269	
F-test	P>0,05				P<0,05	

**Tabuľka 4** Obsah tuku vo vajcovom obsahu

Vek nosníc, týždne	Skupina	n	Tuk g.100 g <sup>-1</sup>			Tuk g.ks <sup>-1</sup>		
			$\bar{x}$	s	Scheffeho test	$\bar{x}$	s	Scheffeho test
34	Kontrolná	31	10,30	0,60	P<0,05	5,20	0,42	P<0,05
	<i>Bacillus subtilis</i>	31	10,80	0,62		5,64	0,36	
61	Kontrolná	20	10,55	0,21	P<0,05	6,40	0,61	P<0,05
	<i>Bacillus subtilis</i>	20	10,61	0,43		6,08	0,49	
F-test	P<0,05							

**Tabuľka 5** Hmotnosť vajcového žĺtku, g

Vek nosníc, týždne	Skupina	n	$\bar{x}$	s	$V_k$
34	Kontrolná	31	14,85	2,07	13,94
	<i>Bacillus subtilis</i>	31	15,20	1,31	8,62
61	Kontrolná	20	18,86	2,01	10,66
	<i>Bacillus subtilis</i>	20	19,06	1,49	7,82
F-test	P>0,05				

Scheffeho test = P>0,05

#### Obsah cholesterolu vo vajcovom žĺtku

Z výsledkov analýzy obsahu cholesterolu vo vajcovom žĺtku vyplýva, že pri jeho vyjadrení v gramoch na 100 g sa vplyvom probiotického doplnku na báze *Bacillus subtilis* (PB6) tendenčne znížil a pri jeho vyjadrení v gramoch na kus sa štatisticky významne (P<0,05) znížil v porovnaní s kontrolnou skupinou. Štatisticky významné zníženie obsahu cholesterolu vo vajcovom žĺtku zaznamenali aj **Li et al. (2006)** vplyvom 0,5, 1,0 a 1,5 g.kg<sup>-1</sup> probiotika

na báze *Bacillus subtilis* v porovnaní s kontrolnou skupinou. Podobne štatisticky významné zníženie obsahu cholesterolu vo vajcovom žĺtku zistili vo svojich experimentoch tiež **Kurtoglu et al. (2004)**, a to vplyvom komerčných krmných probiotík (BioPlus 2B) v dávkach 0,25, 0,5 a 0,75 g.kg<sup>-1</sup> v porovnaní s kontrolnou skupinou. Bez ohľadu na dávku probiotika *Pediococcus acidilactici*, kmeň MA18/5M do krmiva pre nosnice Hy-Line Brown, a to 0,1 g.kg<sup>-1</sup>, ktoré bolo skrmované prvých 12 týždňov

experimentu a ďalších 12 týždňov doplnené 0,05 g.kg<sup>-1</sup>, zistili Mikulski et al. (2012) štatisticky významné zníženie obsahu cholesterolu vo vajcovom žltku o viac ako 10 %. Na zníženie obsahu cholesterolu vo vajcovom žltku vplyvom probiotických kŕmnych doplnkov existuje niekoľko vysvetlení. Je možné, že niektoré z organizmov prítomných v probiotickom doplnku by mohli využívať cholesterol prítomný v gastrointestinálnom trakte pre vlastný bunkový metabolizmus, čím sa zníži množstvo absorbovaného cholesterolu (Nelson a Gilliland, 1984; Gilliland et al., 1985).

Kalavathy et al. (2003) uvádzajú, že kmene laktacidoprodukčných baktérií sú schopné meniť enterohepatálny cyklus a znížiť obsah cholesterolu prostredníctvom asimilácie diétného cholesterolu v bakteriálnej bunke a činnosti žľových kyselín a hydroláz v čreve. Podľa Fukushima a Nakano (1995) vplyvajú kŕmne probiotiká na zníženie obsahu cholesterolu schopnosťou inhibovať enzým hydroxy-metyl-glutaryl-koenzým A reduktázu. V dôsledku inhibície hydroxy-metyl-glutaryl-koenzým A reduktázy sa zníži produkcia mevalonátu, čím sa zníži tvorba a produkcia cholesterolu (Gajdoš et al., 2004).

## ZÁVER

Racionálny prístup k používaniu kŕmnych probiotík v oblasti produkcie konzumných vajec ostáva naďalej otvorený pre ďalší výskum. Na základe literárnych poznatkov uvedených v článku vyplýva, že všetky vhodné probiotiká sa nevyznačujú rovnakými účinkami na hmotnosť vajec, hmotnosť žltka a obsah tuku, resp. cholesterolu vo vajcovom žltku. Výsledky mnohých experimentov v tomto smere však naznačili tendenciu pozitívneho vplyvu. Na základe výsledkov našich bilančných pokusov s kŕmnym probiotickým doplnkom na báze *Bacillus subtilis* (PB6) v dávke 1 g.kg<sup>-1</sup>, min. 2,3.10<sup>8</sup> KTJ.g<sup>-1</sup> možno konštatovať, že pri konzumných vajciach nosníc ISA Brown sa tendenčne zvýšila hmotnosť vajec, vajcového obsahu, vajcového žltka a štatisticky významne (P<0,05) sa zvýšil obsah tuku vo vajcovom obsahu a znížil obsah cholesterolu vyjadrený na kus vajcového žltka. Pri obsahu cholesterolu vo vajcovom žltku vyjadrenom na 100 g sa naznačila tendencia jeho zníženia vplyvom probiotika *Bacillus subtilis* (PB6). Nejednotnosť v dosahovaných výsledkoch vplyvom komerčných probiotických produktov, ako vyplýva z literárnych poznatkov, môže súvisieť s druhom probiotického produktu, dávkou a aktivitou. Na základe literárnych poznatkov možno konštatovať, že pri používaní probiotických produktov vo výskume produkcie konzumných vajec má byť charakterizované každé probiotikum podľa jeho vplyvu na fyziologický stav črevného traktu nosnice. Aj keď sa dosiahol určitý pokrok v oblasti výskumu probiotík pri produkcii konzumných vajec, ich pozitívny vplyv vo vzťahu ku kvalite a bezpečnosti vajec je chápané ako symbiotický vzťah medzi hosťiteľom (nosnicou) a črevnými mikroorganizmami. V tejto oblasti sú nedostatočné poznatky. Nejednotnosť vo výsledkoch vplyvu kŕmnych probiotík pravdepodobne súvisí s uvedeným vzťahom.

## LITERATÚRA

- Abdulrahim, S. M., Haddadin, S. Y., Hashlamoun, E. A., Robinson, R. K. 1996. The influence of *Lactobacillus acidophilus* and bacitracin on layer performance of chickens and cholesterol content of plasma and egg yolk. *British Poultry Science*, vol. 37, p. 341-346. <http://dx.doi.org/10.1080/00071669608417865> PMID:8773843
- Arpášová, H., Kačániová, M., Haščik, P., Šidlová, V. 2012. Effect of selected feed additives on internal quality parameters of table eggs. *Potravinarstvo*, vol. 6, no. 4, p. 52-61. <http://dx.doi.org/10.5219/235>
- Aslı, M. M., Hosseini, S. A., Lotfollahian, H., Shariatmadari, F. 2007. Effect of probiotics, yeast, vitamin E and vitamin C supplements on performance and immune response of laying hen during high environmental temperature. *International Journal of Poultry Science*, vol. 6, no. 12, p. 895-900. <http://dx.doi.org/10.3923/ijps.2007.895.900>
- Bailey, J. S. 1987. Factors affecting microbial competitive exclusion in poultry overview-outstanding symposia in food science and technology. *Food Technology*, p. 88-92.
- Capcarová, M., Chmelničná, L., Kolesarová, A., Massanyi, P., Kovačík, J. 2010. Effect of *Enterococcus faecium* M 74 strain on selected blood and production parameters of laying hens. *British Poultry Science*, vol. 51, no. 5, p. 614-620. <http://dx.doi.org/10.1080/00071668.2010.513961>, PMID:21058064
- Coates, M. E., Fuller, R. 1977. The genotobiotic animal in the study of gut microbiology. In Clarke, R. T. J., Bauchop, T.: *Microbial Ecology of the Gut*. Academic Press : London, p. 311-346.
- Dunham, H. J., William, C., Edens, F. W., Casas, I. A., Dobrogosz, W. J. 1993. *Lactobacillus reuteri* immunomodulation of stressor associated disease in newly hatched chickens and turkeys. *Poultry Science*, vol. 72 (Suppl. 1), p. 103.
- Earl, A. M., Losick, R., Kolter, R. 2007. *Bacillus subtilis* genome diversity. *Journal of Bacteriology*, vol. 189, p. 1163-1170. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01343-06> PMID:17114265
- Fukushima, M., Nakano, M. 1995. The effect of a probiotic on faecal and liver lipid classes in rats. *British Journal Nutrition*, vol. 73, p. 701-710. <http://dx.doi.org/10.1079/BJN19950074> PMID:7626589
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. A review. *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 66, p. 365-378. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x> PMID:2666378
- Gajdoš, M., Cibulová, E., Krivošíková, Z. 2004. Rosuvastatin: nový inhibitor 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzým A reduktázy. In *Via Practica*, vol. 1, p. 21-22.
- Gallazzi, D., Giardini, A., Mangiagalli, M. G., Marelli, S., Ferrazzi, V., Orsi, C., Cavalchini, L. G. 2008. Effects of *Lactobacillus addophilus* D2/CSL on laying hen performance. *Italian Journal of Animal Science*, vol. 7, 2008, no. 1, p. 27-37.
- Gilliland, S. E., Kim, S. H. 1984. Effect of viable starter culture bacteria in yogurt on lactose utilization in humans. *Journal of Dairy Science*, vol. 97, p. 1-6. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81260-6](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81260-6) PMID:6707296
- Gilliland, S. E., Nelson, C. R., Maxwell, C. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 49, p. 377-381. PMID:3920964
- Haddadin, M. S. Y., Abdulrahim, S. M., Hashlamoun Nahashon, E. A. R. S. N., Nakaue, H. S., Mirosh, I. W.,

- Robinson, R. K. 1996. The effects of *Lactobacillus acidophilus* on the production and chemical composition of hen's eggs. *Poultry Science*, vol. 75, p. 491-494. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.0750491> PMID:8786938
- Ingr, I., Simeonová, J. 1983. Rýchle stanovení cholesterolu ve vaječném žloutku Bio-la-testem. *Veterinary Medicine - Czech*, vol. 28, p. 97-104. PMID:6405530
- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., Jalaludin, S. 1996. Influence of dried *Bacillus subtilis* and lactobacilli cultures on intestinal microflora and performance in broilers. *Asian-australas. Journal Animal Science*, vol. 9, p. 397-404.
- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., Jalaludin, S. 1997. Effect of adherent *Lactobacillus* culture on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. *Animal Feed Science Technology*, vol. 70, p. 197-209. [http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)00080-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00080-1)
- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., Jalaludin, S. 1998. Growth performance, intestinal microbial populations and serum cholesterol of broilers diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poultry Science*, vol. 77, p. 1259-1265. PMID:9733111
- Kačániová, M., Bobček, R., Kmeť, V., Angelovičová, M. 2005. *Kŕmne doplnky ako náhrada antibiotík a ďalšie aplikácie*. Nitra : SPU, 2005, 78 p. ISBN 80-8069-589-X.
- Kačániová, M., Nováková, I., Haščík, P. 2011. *Význam probiotík a ich význam na mikróflóru gastrointestinálneho traktu hydiny*. Nitra : SPU, 181 p. ISBN 978-80-552-0655-4.
- Kalavathy, R., Abdullah, N., Jalaludin, S. Ho, Y. W. 2003. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. *British Poultry Science*, vol. 44, p. 139-144. <http://dx.doi.org/10.1080/0007166031000085445>, PMID:12737236
- Kurtoglu, V., Kurtoglu, F., Seker, E., Coskun, B., Balevi, T., Polat, E. S. 2004. Effect of probiotic supplementation on laying hen diets on yield performance and serum and egg yolk cholesterol. *Food Additives and Contaminants*, vol. 21, no. 9, p. 817-823. <http://dx.doi.org/10.1080/02652030310001639530> PMID:15666974
- Li, L., Xu, C. L., Ji, C., Ma, Q., Hao, K., Jin, Z. Y., Li, K. 2006. Effects of a dried *Bacillus subtilis* culture on egg quality. *Poultry Science*, vol. 85 no. 2, p. 364-368. PMID:16523640
- Lyon, T. P. 1987. Probiotics: an alternative to antibiotics. *Pig News Information*, vol. 8, no. 2, p. 157-164.
- Mahdavi, A. H., Rahmani, H. R., Pourreza, J. 2005. Effect of probiotic supplements on egg quality and laying hens performance. *International Journal Poultry Science*, vol. 4, no. 4, p. 488-492.
- Mohan, B., Kadirvel, R., Bhaskaran, M., Natarajan, A. 1995. A Effect of probiotic supplementation on serum/yolk cholesterol and on egg shell thickness in layers. *British Poultry Science*, vol. 36, p. 799-803. <http://dx.doi.org/10.1080/00071669508417824> PMID:8746981
- Mikulski, D., Jankowski, J., Naczmanski, J., Mikulska, M., Demey, V. 2012. Effects of dietary probiotic (*Pediococcus acidilactici*) supplementation on performance, nutrient digestibility, egg traits, egg yolk cholesterol, and fatty acid profile in laying hens. *Poultry Science*, vol. 91, no. 10 2691-2700. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2012-02370> PMID:22991559
- Nahashon, S. N., Nakaue, H. S., Mirosh, L. W. 1992. Effect of direct-fed microbials on nutrient retention and production parameters of laying pullets. *Poultry Science*, vol. 71 (suppl. 1), p. 111.
- Nahashon, S. N., Nakaue, H. S., Mirosh, L. W. 1993. Effect of direct fed microbials on nutrient retention and productive parameters of Single Comb White Leghorn pullets. *Poultry Science*, vol. 72 (Suppl. 1), p. 87.
- Nelson, C. R., Gilliland, S. E. 1984. Cholesterol uptake by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal Dairy Science*, vol. 67 (Suppl. 1): p. 50.
- Patterson, J. A., Burkholder, K. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*, vol. 82, no. 4, p. 627-631. PMID:12710484
- Prins, R. A. 1977. Biochemical activities of gut microorganisms. In Clarke, R. T. J., Hauchop, T.: *Microbial ecology of the gut*. Academic press : London, p. 73-183.
- Ramasamy, K., Abdullah, N., Jalaludin, S., Wong, M., Ho, Y. W. 2009. Effects of *Lactobacillus* cultures on performance of laying hens, and total cholesterol, lipid and fatty acid composition of egg yolk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 89, 2009, no. 3, p. 482-486. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3477>
- Rolf, R. D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition*, vol. 130, p. 396S-402S. PMID:10721914
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Mattila-sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, vol. 84, p. 197-215. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00375-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00375-8)
- SAS Institute. SAS User's Guide: Statistics, 5<sup>th</sup> Edn.; SAS : Cary, NC, USA, 1985.
- Sun, X. 2005. *Broiler performance and intestinal alterations when fed drug-free diets* : Thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.
- Toms, C., Powrie, F. 2001. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Microbes and Infection*, vol. 3, p. 929-935. [http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01454-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01454-X)
- Yalcin, S., Guclu, B. K., Oguz, F. K. 2002. The usage of enzyme, probiotic and antibiotic in laying hen rations. *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, vol. 49, 2002, no. 2., p. 135-141.

**Acknowledgments:**

This study was supported by VEGA 1/0007/11.

**Contact address:**

Mária Angelovičová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Hygiene and Food Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: maria.angelovicova@uniag.sk.

Ebrahim Alfaig, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Hygiene and Food Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: ibrelfaig@gmail.com.

Martin Král, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Hygiene and Food Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: martinxkral@gmail.com.

Jana Tkáčová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Hygiene and Food Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: tkacova.jt@gmail.com.