

계란 난황 레시틴 추출 부산물이 사료 내 Ca 함량을 조절한 산란계의 생산성과 Ca 흡수에 미치는 영향

한종권¹, 오미향¹, 남정옥¹, 지기쁨¹, 심인숙², 박근태^{1*}

Efficacy of Supplemental Lecithin-free Egg Yolk at Different Dietary Calcium Levels on Growth Performance and Ca Absorption of Laying Hens

Jong-Kwon Han¹, Mihyang Oh¹, Jungok Nam¹, Kibbeum Ji¹, Insuk Sim², Keun-Tae Park^{1*}

Received: 5 December 2014 / Revised: 5 March 2015 / Accepted: 2 April 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: A 3-weeks feeding trial with 288 laying hens were conducted to determine the efficacy of lecithin-free egg yolk at different levels of dietary Ca on performance and Ca absorption. Laying hens were divided into 6 groups according to calcium level and testing agent; 0% calcium feed (A), 0.2% calcium feed (B), 0.4% calcium feed (C, normal feed), 0.6% calcium feed (D), 0.4% calcium feed + 0.2% egg byproduct (C+0.2), 0.4% calcium feed + 0.4% egg byproduct (C+0.4). The final body weight gain of C+0.2 and C+0.4 groups were higher by 1.5% and 7.4% respectively than group C. Tibia ash contents did not show significantly difference, but calcium contents increase ($p < 0.05$) in C+0.2 and C+0.4 groups. Parallel undecalcified tibia joint sections were stained for calcium absorption by the von Kossa's stain. This result show that lecithin free egg byproduct supplementation to normal calcium feed improved growth performance and calcium utilization in laying hens.

Keywords: Calcium absorption, Bone growth, Lecithin extracted byproduct of egg

1. INTRODUCTION

Ca은 영양 성분 중에 가장 많이 알려진 미네랄로서, 인체 내에서 가장 고농도로 존재하는 필수 무기질이다. Ca은 뼈와 치아 성분을 보충하는 대표적 영양 성분이며 근육의 수축, 이완 조절, 신경세포내의 정보전달, 혈액응고, 효소의 활성화 등 신체조직의 기능유지에 필요한 성분이다 [1,2].

산란계로부터 생산되는 계란의 난각은 calcium carbonate가 약 98%로 산란계 사료내의 충분한 Ca 공급이 대단히 중요하며, 난각질에 직결되는 가장 큰 요소이다. 또한, 산란율과 주령에 따라 적절하게 급이되어야 하며, 이러한 균형이 무너지면 난각질에 심각한 영향을 미치게 되어 상업적으로 큰 손실이 발생할 수 있다 [3,4]. 따라서 산란계의 Ca 적정 급이 수준에 대한 많은 연구가 진행되어 왔으며 1962년 개정된 NRC 사양표준에서는 Ca 급여수준을 2.25%에서 2.75%로 높였으며, 여러 연구 발표에 따르면 Ca의 적정 급여수준은 2.71~2.75%라고 보고하였다 [5].

가금류의 체기능을 유지하기 위해 필요한 광물질 중에서 Ca은 가장 주의가 필요하며, 인 (P)과 비타민 D등 여러 가지 복합적 요인들이 관련되어 있다. 칼슘의 99% 이상이 뼈에 함유되어 있으며 골격형성에 필수적인 요소로서, Ca 공급이 부

¹(주)미래자원 ML 신소재 연구소

¹Department of Research and Development Center, Milae Resource ML Co. Ltd, Seoul 138-050, Korea

Tel: +82-2-2203-7397, Fax: +82-2-2203-7398

e-mail: ktpark@milaeml.com

²고려대학교 대학원 의생명융합과학과

²Department of intergrated Biomedical and Life Sciences, College of Health Science, Korea University, Seoul 136-703, Korea

족할 경우 뼈의 발육과 난각 형성에 큰 저해를 가져온다 [6,7].

레시틴은 콩, 달걀, 해산물, 유채, 목화씨 등에서 추출되고, 뇌세포를 활성화시키는 정보전달물질인 아세틸콜린 (acetylcholine)을 만들기도 하며, 미국에서는 치매환자에게 레시틴을 공급하여 아세틸콜린이 증가했다는 발표도 있다 [8,9]. 레시틴의 이용성이 높아짐에 따라 산업적으로 규모가 매우 커졌으나, 추출하고 남은 부산물은 환경오염의 원인이 될 수 있다. 특히 난황에서 레시틴을 추출하고 남은 부산물은 연간 약 50톤이며, 대부분 폐기되고 있는 실정이다 [10]. 난황에서 레시틴을 추출하고 남은 부산물에는 약 60% 이상의 단백질이 함유되어 있으며, 효소로 가수분해시킨 가수분해물의 항산화 활성 정도를 평가한 결과, α -tocopherol보다도 높은 항산화 효과를 지닌다고 보고되었다 [11].

본 연구에서는 난황 레시틴 추출 부산물을 이용한 뼈 성장 촉진 및 강화소재로서 사료첨가제의 유효성을 검토하기 위해, 산란계를 사용하여 Ca 이용성, 증체량, Ca 침착 정도를 확인하여 우수한 Ca 흡수 촉진제로서의 가능성을 제시하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 난황 레시틴 추출

본 실험에 사용한 시료는 계란 난황으로부터 레시틴을 추출하고 남은 부산물을 사용하였으며, 경기도 용인 소재의 두산 글로넷 (Doosan corporation Glonet, Biotech business division) 으로부터 구입하였다.

난황으로부터 레시틴을 추출하고 남은 부산물은 지질을 제거하고 단백질만 분리하였다. 난황 레시틴 추출 부산물 30 g 에 1% KOH용액 150 mL, methanol 150 mL을 첨가 후 50°C에서 4시간 교반하였다. 3,900 g, 10분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후, 침전물을 acetone으로 수 차례 세척하여 지질을 제거하였고, 2% 2-mercaptoethanol로 계란 노른자 단백질을 환원시킨 뒤 동결건조하여 실험시까지 보관하였다 [12].

2.2. 실험동물 및 식이

1일령의 산란계 (Hy-line brown) 수평아리를 구입하여 7일간 적응기간을 거친 후 산란계 288마리를 6그룹으로 나누어 각각 12마리씩 4반복으로 실험하였다. 실험사료는 NRC (National Research Council) 사양 표준에 의한 semi purified 산란계 전기 사료를 배합하였으며, 사료 내 Ca 함량만 조절하였다 (Table 1). 산란계 전기 사료에 Ca 함량을 0% (A), 0.2% (B), 0.4% (C), 0.6% (D) 를 각각 첨가하였고, Ca 0.4%를 첨가한 사료에 난황 레시틴 추출 부산물을 0.2% (C+0.2), 0.4% (C+0.4)를 각각 첨가하여 실험설계를 하였다. 사료 및 평균된 음수를 자율 급여하였으며, 실험기간 동안 사료 섭취량과 체중은 주 2회 측정하고, 점등시간은 1일 23시간이 되도록 하였다. 22일령에 실험 종료하였고 종료일에 희생시켜 좌우 경골 (tibia)를 적출하여 분석에 사용하였다.

2.3. 경골 시료 수집

실험기간 종료 후 실험동물들을 희생하여 경골을 적출하여 골격에 붙어있는 조직은 모두 제거하여 무게를 측정 후, 분석시까지 -20°C에 보관하였다. 조직 염색할 경골은 곧바로 10% formalin에 넣어 실온 보관하였다.

2.4. 회분함량 및 Ca 함량 분석

적출한 경골의 무게를 측정하고, dry oven을 사용하여 105°C에서 건조하였다. 건조 후 무게를 측정 후 600°C의 회화로에서 8시간 회화하여 총 회분함량을 얻었다. 회화된 회분은 1 N HCl에 용해한 후 1% La_2O_3 로 희석하여 원자흡광광도계 (USA, California) 로 Ca 함량을 측정하였다 [13].

2.5. 경골 조직 Ca 염색

대퇴부 뼈를 적출하여 근육, 인대, 지방조직을 모두 제거하고 10% neutral formalin에 24시간 동안 고정 후 von Kossa's stain을 하였다. 고정 후 파리핀 블록을 제작하여 3 μm 의 두께로 박절하였다. 2.5% silver nitrate 용액으로 30분간 처리한 후 세척한 다음 sodium carbonate formaldehyde 용액으로 3분간 처리 및 세척하여 염색된 Ca를 광학 현미경 (Leica, Germany, Frankfurt)으로 관찰하였다.

2.6. 통계 분석

통계분석은 SPSS program (SPSS Inc., Chicago, USA)을 이용하여 평균과 표준편차 (mean \pm SD)로 제시하였으며, 각 그룹의 유의성 분석은 시험그룹의 측정치에 대해 Student *t*-test 검정을 사용하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 계란의 레시틴 추출 부산물의 산란계 사료 첨가 급여

Ca 함량을 조절한 산란계 전기 사료에 계란의 레시틴 추출 부산물을 첨가하여 산란계의 성장에 미치는 영향을 평가하였다 (Table 2). Ca이 0% 첨가된 A 그룹은 증체량이 60.0 \pm 14.2 g으로 정상 Ca 함량인 0.4% 그룹 C의 증체량인 162.2 \pm 11.6 g에 비해 약 40%에도 미치지 못했다. 또한, B그룹의 증체량이 121.8 \pm 15.0 g로 C그룹에 비해 약 74%의 증체량을 보였다. 하지만 C와 D그룹의 Ca 함량은 산란계 사료의 정상 함량인 0.4%와 1.5배를 더 첨가한 0.6%이며, 두 그룹에서는 162.2 \pm 11.6 g와 164.4 \pm 10.0 g으로 유의한 차이를 보이지 않았다. Ca 함량이 적어짐에 따라 개체의 증체량이 유의하게 감소되는 것을 확인하였으며, Ca의 결핍은 성장에 막대한 영향을 준다는 것을 확인하였다. 하지만, C와 D그룹은 권장량의 Ca이 섭취되면, 추가로 Ca을 공급하더라도 부수적인 성장은 없는 것으로 확인되었다.

계란 레시틴 추출 부산물을 급여한 C+0.2와 C+0.4그룹의 증체량은 각각 164.6 \pm 5.8 g, 173.8 \pm 10.6 g으로 증가하는 경향을 확인하였으나 유의한 차이를 보이지는 않았다. 특히, C+

Table 1. Composition and nutritional values of laying hens diets

	Basal diet		Ca supplemented level			LFEY ¹⁾	
	0%	0.20%	0.40%	0.60%	0.4% Ca+ 0.2% LFEY	0.4% Ca+ 0.4% LFEY	
Ingredients	%	%	%	%	%	%	
Corn, yellow	68.4	68.4	68.4	68.4	68.4	68.4	
Glucose	5	4.18	3.25	2.33	3.05	2.85	
SPC ²⁾	20	20	20	20	20	20	
Soybean oil	2	2.3	2.7	3.1	2.7	2.7	
DL-methionine	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
Tryptophan	0	0	0	0	0	0	
CaCO ₃	0	0.52	1.05	1.57	1.05	1.05	
LFEY	0	0	0	0	0.2	0.4	
KH ₂ PO ₄	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	
NaH ₂ PO ₄	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	
NaCl	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	
Choline-Cl	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
Vit-Min premix ³⁾	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
Cellulose	3	3	3	3	3	3	
Sum	100	100	100	100	100	100	
ME ⁴⁾	3089.8	3086.5	3088.1	3090	3088.1	3088.1	
CP ⁵⁾	19.04	19.04	19.04	19.04	19.04	19.04	
C fiber	5.04	5.04	5.04	5.04	5.04	5.04	
Linoleic	2.15	2.31	2.51	2.71	2.51	2.51	
CaCO ₃	0.08	0.28	0.48	0.68	0.48	0.48	
Pavl ⁶⁾	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	
Na	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	
K	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	
Met	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	
TSAA ⁷⁾	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	
Lysine	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	
TRP	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	
His	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
Thr	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	
Arg	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	

¹⁾LFEY: Lecithin free egg yolk, ²⁾SPC: soy protein concentrated, ³⁾Vitamin contains followings in 1kg: Vit A, 10,000 IU; vit D3, 5,000 IU; vit E, 20 IU; Vit K3, 3 mg; Vit B1, 2 mg; Vit B2, 6 mg; Vit B6, 3 mg; Vit B12, 0.016 mg; niacin, 50 mg; Ca-pantothenate, 13 mg; Folic acid, 13 mg; Cu, 5 mg; I, 1.25 mg; Mn, 110 mg; Zn, 100 mg; Se, 0.3 mg; Fe, 40 mg; Co, 5 mg, ⁴⁾Me: metabolizable energy, ⁵⁾CP: crude protein, ⁶⁾Pavl: available phosphorus, ⁷⁾TSAA: total sulfur amino acids

0.4그룹은 C그룹에 비해 약 7.4% 증체량이 개선되었으며, 이는 계란 레시틴 추출 부산물 내의 기타 난황 단백질이 작용했을 것으로 예상된다.

3.2. 경골의 회분량 및 무게

경골의 중량과 회분량은 Table 3과 같다. A그룹과 B그룹은 각각 1.29±0.15 g, 1.68±0.19 g이었으며, C와 D그룹은 각각 2.38±0.23 g, 2.72±0.22 g으로 A, B 그리고 C그룹에서 유의하게 감소하였다. 계란 레시틴 추출 부산물을 첨가 급여한 C+0.2그룹과 C+0.4그룹의 중량은 각각 2.56±0.13 g, 2.68±0.14 g으로 C에 비해 유의하게 증가하였다 ($P<0.05$). 측정 결과 동일한 양의 Ca를 첨가한 C, C+0.2, C+0.4그룹 간에 난황 레시틴 추출 부산물을 추가로 첨가한 그룹에서 경골 자체의 무게가 유의하게 증가하는 것을 확인하였다.

한편, 경골내에 존재하는 지방을 모두 제거하고 회분량을 측정하였다. 측정 결과 경골의 Ca 함량과 유사한 경향을 확인하였으며, 회분량은 Ca 함량이 가장 높은 D그룹에서 가장 높았다. 또한, C그룹에 비해 C+0.2, C+0.4그룹에서 유의한 증가는 보이지 않았으나 다소 증가하는 경향을 확인할 수 있었다.

3.3. Ca 섭취량 및 경골 내 Ca 함량

산란계의 사료 섭취량 내 Ca 함량을 계산하여 개체 당 실제 Ca 섭취량을 계산하였으며, 경골 내 Ca 함량을 원자흡광광도계로 Ca 함량을 측정하였다. 사료 내 그룹별 Ca 섭취량 및 경골의 Ca 함량 결과는 Table 4와 같다. 실제 사료 내 첨가한 Ca 과 섭취된 Ca의 비율은 일치하지 않았다. 그 이유는 Ca 함량이 적을수록 실험 기간 동안 사료 섭취량이 월등히 감소하기 때문이며, A와 B그룹에서 Ca 섭취량이 C그룹에 비해 약 10~

Table 2. Effect on body weight, feed intake and feed efficiency of broiler fed various feed additive for 3weeks

Group	Feed intake (g/bird)	Weight gain (g/bird)	FCR ¹⁾
A ²⁾	179.6±29.7 ^b	60.0±14.2 ^c	3.04±0.29 ^a
B ³⁾	304.7±65.4 ^a	121.8±15.0 ^b	2.52±0.51 ^b
C ⁴⁾	339.6±49.9 ^a	162.2±11.6 ^a	2.11±0.43 ^{bc}
D ⁵⁾	328.0±33.5 ^a	164.4±10.0 ^a	1.99±0.10 ^{bc}
C+0.2 ⁶⁾	343.9±39.7 ^a	164.6±5.8 ^a	2.09±0.22 ^{bc}
C+0.4 ⁷⁾	337.7±30.9 ^a	173.8±10.6 ^a	1.95±0.23 ^c

¹⁾FCR: Feed conversion ratio, ²⁾A: 0% Ca additive, ³⁾B: 0.2% Ca additive, ⁴⁾C: 0.4% Ca additive, ⁵⁾D: 0.6% Ca additive, ⁶⁾C+0.2: 0.4% Ca and 0.2% egg byproduct additive, ⁷⁾C+0.4: 0.4% Ca and 0.2% egg byproduct additive.

^{a-c}Values (Mean±SE) within columns no common differ significantly ($p<0.05$).

Table 3. The amount of wet weight and ash of the tibia of laying hens fed lecithin free egg yolk for 3 weeks

Group	Wet weight (g)	Ash (%) ¹⁾
A ¹⁾	1.29±0.15 ^b	35.9±3.54 ^b
B ²⁾	1.68±0.19 ^b	42.99±2.09 ^b
C ³⁾	2.38±0.23 ^b	48.98±1.98 ^a
D ⁴⁾	2.72±0.22 ^a	54.11±1.40 ^a
C+0.2 ⁵⁾	2.56±0.13 ^a	49.47±1.56 ^a
C+0.4 ⁶⁾	2.68±0.14 ^a	50.78±1.74 ^a

¹⁾A: 0% Ca additive, ²⁾B: 0.2% Ca additive, ³⁾C: 0.4% Ca additive, ⁴⁾D: 0.6% Ca additive, ⁵⁾C+0.2: 0.4% Ca and 0.2% egg byproduct additive, ⁶⁾C+0.4: 0.4% Ca and 0.2% egg byproduct additive.

^{a,b}Values (Mean±SE) within columns no common differ significantly ($p<0.05$).

50% 수준에 머물렀다. Ca 무첨가 그룹인 A에서 Ca 함량이 존재하는 이유는 기타 원료 내에 존재하는 Ca의 양이다. C와 C+0.2, C+0.4그룹의 Ca 섭취량은 거의 동일하였으며, D그룹

Table 4. The amount of Ca intake in feed and Ca contents in tibia of laying hens fed lecithin free egg yolk for 3 weeks

Group	Ca intake	Ca contents in bone
A ¹⁾	0.14±0.02 ^b	6.64±1.86 ^b
B ²⁾	0.85±0.18 ^b	12.1±2.69 ^b
C ³⁾	1.63±0.24 ^a	14.14±1.28 ^b
D ⁴⁾	2.23±0.23 ^b	15.25±3.92 ^b
C+0.2 ⁵⁾	1.65±0.19 ^a	14.75±3.14 ^a
C+0.4 ⁶⁾	1.62±0.15 ^a	14.97±2.83 ^a

¹⁾A: 0% Ca additive, ²⁾B: 0.2% Ca additive, ³⁾C: 0.4% Ca additive, ⁴⁾D: 0.6% Ca additive, ⁵⁾C+0.2: 0.4% Ca and 0.2% egg byproduct additive, ⁶⁾C+0.4: 0.4% Ca and 0.2% egg byproduct additive.

^{a,b}Values (Mean±SE) within columns no common differ significantly ($p<0.05$).

에서 약 37%의 Ca을 더 섭취하였다.

실제 경골의 Ca 함량을 측정된 결과 A와 B그룹은 C그룹에 비해 유의하게 감소하였으며, D그룹에서 가장 높았다. 본 결과는 Ca 섭취량이 증가하면 대퇴골의 Ca 함량이 증가한다는 보고를 뒷받침해준다 [14,15]. 한편, 계란 레시틴 추출 부산물을 급여한 C+0.2와 C+0.4에서는 D그룹의 수준에 미치지 못하였지만, C그룹에 비해 Ca 함량이 증가하는 것을 확인하였다 ($p<0.05$). 이는 3주의 단기간 실험임에도 계란 레시틴 추출 부산물의 식이가 Ca이 빠르게 침착되는데 도움을 준다는 결과이다.

3.4. 대퇴부 관절의 Ca 염색

실험 종료하고 경골 적출 후 해부학적 자세에서 lateral tibial joint 부분의 Ca 흡착 여부를 육안으로 확인하기 위해 von Kossa's stain을 실시하였다 (Fig. 1). 경골의 관절부분을 현미경 검정 결과 A그룹에서는 타 그룹에 비해 검정색 Ca 부분이 매우 적은 양으로 침착되어 있는 것을 확인하였다. B그룹은 Ca이 전체적으로 침착되어 있으나 두께가 얇아 육안으로도

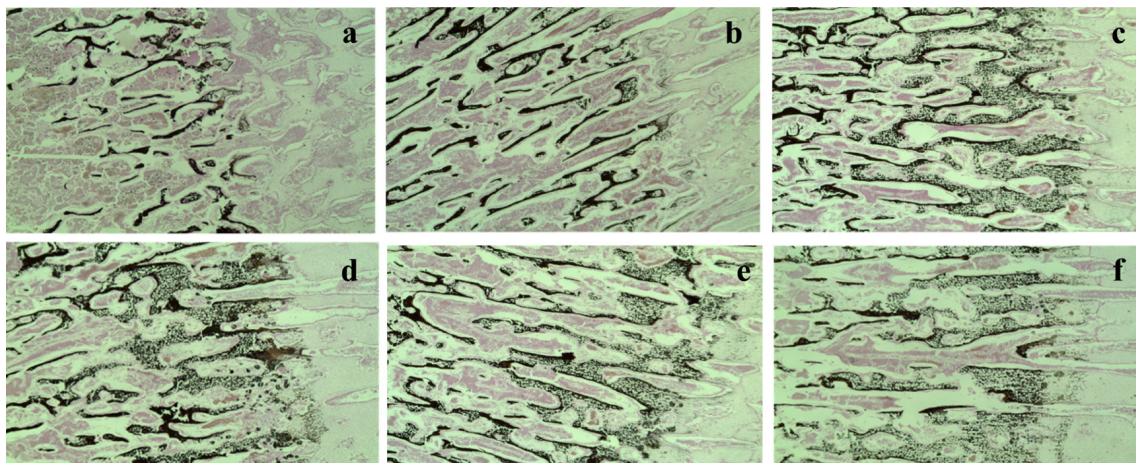


Fig. 1. Effect of lecithin extracted byproduct of egg on calcium absorption in lateral tibia joint. Calcium content is visualized with von Kossa's staining (black color, 50 x). (a) 0% Ca feed, (b) 0.2% Ca feed, (c) 0.4% Ca feed, (d) 0.6% Ca feed, (e) 0.4% Ca and 0.2% lecithin free egg yolk, (f) 0.4% Ca and 0.4% lecithin free egg yolk.

Ca이 적은 것을 확인하였다. C와 D, C+0.2, C+0.4그룹 간에는 골고루 많은 양의 Ca이 침착되어 있는 것을 확인할 수 있었으나, 네 그룹들 간에 Ca 침착량을 육안으로 판단하기에는 어려웠다.

4. SUMMARY

본 연구에서는 산란계의 *in vivo* 실험을 통하여 난황 레시틴 추출 부산물이 산란계의 뼈의 Ca 침착과 성장에 도움을 줄 수 있다는 결과를 얻었다. 산란계 전기 사료에 Ca의 수준을 0%, 0.2%, 0.4%, 0.6%로 조절하여 실험한 결과 증체량에서 0%, 0.2% Ca을 첨가한 그룹의 증체량은 유의적으로 감소하였으나 0.4%, 0.6% 첨가 그룹에서는 정상적인 성장율을 확인하였다. 반면에 0.4% Ca을 첨가한 그룹에 레시틴 추출 부산물을 0.2%, 0.4% 첨가한 그룹에서 각각 1.5%, 7.1%로 증가하여 농도의존적으로 증가하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 없었다. 실제 산란계의 경골을 적출하여 중량, 회분, Ca의 함량을 조사한 결과 경골 중량에서는 0.4% Ca 첨가그룹에 비해 레시틴 추출 부산물을 추가로 첨가한 그룹에서 각각 8.4%, 13.4%로 증가하는 경향을 확인하였다. 회분량에서도 0.4% 첨가 그룹에 비해 레시틴 추출 부산물 첨가그룹에서 증가하였지만, 유의한 차이는 없었다. 경골내의 Ca 함량을 조사한 결과는 0.4% Ca 첨가그룹에 비해 레시틴 추출 부산물이 4.3%, 5.9%가 각각 유의한 경향으로 증가하였다. 경골에 실제로 Ca이 흡수되었는가를 확인하기 위하여 lateral femoral joint 부분을 von Kossa's stain을 실행한 결과 Ca 결핍 그룹에서 Ca 축적이 현저히 감소한 것을 확인한 반면, 그 외 그룹에서는 Ca이 충분히 침착되어 있었으며 산란계 사료내의 적정 Ca 함량이 0.4%라는 것을 다시 한번 확인하였다.

본 연구에서는 계란 난황의 레시틴 추출 부산물의 단백질 분획 소재를 이용하여 뼈 성장 촉진 인자 및 Ca 흡수 촉진 보조제로서의 가능성을 보여줬으며, 그 기대를 높이기 위해 혈액 분석, 측정항목의 세분화 등 반복적인 연구가 수반되어야 하겠다.

REFERENCES

- Allen, L. H. (1982) Calcium bioavailability and absorption: A review. *AM.J. Clin. Nutr.* 35: 783-808.
- Rosalind S. G. (1994) Content and bioavailability of trace elements in vegetarian diets. *Am. J. Clin.* 59: 1223-1232.
- Cooke A. S. and A. A. Bell Press I (1976) Egg shell characteristics and incidence of shell breakage for grey herons ardea cinerea exposed to environmental pollutants. *Environ. Pollut.* 11: 59-84.
- David A. (1986) Eggshell quality versus limestone and the importance of particle size or solubility of calcium source. *World Poult. Sci.* 42: 166-171.
- Harms R. and P. Waldroup (1961). The influence of dietary calcium level and supplementary ascorbic acid and/or dienestrol diacetate upon performance of egg production type hens. *Poult. Sci.* 40: 1345-1348.
- Peter, V. H. and L. R. Margaret (1978) Vitamin K dependence of a calcium binding protein containing γ -carboxyglutamic acid in chicken bone. *J. Biol. Chem.* 25: 9063-9068.
- Kevin, L. W. and L. L. Southern (1991) Effect of dietary sodium zeolite A and graded levels of calcium on growth, plasma, and tibia characteristic of chicks. *Poult. Sci.* 70: 2295-2303.
- Madelyn, J. H. and J. W. Richard (1978) Lecithin consumption increases acetylcholine concentrations in rat brain and adrenal gland. *AAAS.* 202: 223-224.
- Richard, J. W., H. G. John, and J. H. Madelyn (1977) Lecithin consumption raises serum free choline levels. *Lancet.* 310: 68-69.
- Park, P. J., W. K. Jung, Y. R. Choi, and S. K. Kim (2000) Antioxidative effect of enzymatic protein hydrolysate from lecithin-free egg yolk. *Korean J. Life Sci.* 10: 131-139.
- Park, P. J., W. K. Jung, K. S. Nam, F. Shahidi, and S. K. Kim (2001) Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin free egg yolk. *JAACS* 78: 651-656.
- James, F. L. and F. W. Dorcas (1984) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in some Canadian commercial fish, shellfish, and meat products by liquid chromatography with confirmation by capillary gas chromatography mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 32: 789-794.
- David, L. T. and F. F. Esther (1996) Determination of calcium in urine and serum by atomic absorption spectrophotometry (AAS). *Clin. Chem.* 13: 101-114.
- Bakary, D., P. Ann, C. Mustapha, M. Dorothy, J. C. Tim, and M. P. Elizabeth (1999) Effect of calcium supplementation on bone mineral accretion in Gambian children accustomed to a low calcium diet. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 544-549.
- Donahue, H. J., R. S. Mazzeo, and S. M. Horvath (1998) Endurance training and bone loss in calcium deficient and ovariectomized rats. *Metabolism* 37: 741-744.