

## Lignosulfonate처리 대두박의 반추위 내 미생물 발효특성에 미치는 영향

이훈정 · 이승현 · 배귀석 · 박제환 · 장문백\*

중앙대학교 동물자원과학과

### Effects on the Rumen Microbial Fermentation Characteristics of Lignosulfonate Treated Soybean Meal

HunJong Lee, SeungHeon Lee, GuiSeck Bae, JeHwan Park and MoonBaek Chang\*

Department of Animal Science & Technology, Chung-Ang University

#### ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effects on fermentation characteristics of rumen microorganism by different types and levels of lignosulfonate treated soybean meal (LSBM) in *in vitro* test and rumen simulation continuous culture (RSCC) system in dairy cows.

The experiment I was control and 12 treatments (each with 3 replications) *in vitro* test to demonstrate composition of different types of treatments with lignosulfonate (Desulfonate, Na, Ca and solution) and levels (2, 4 and 8%) of soybean meal in the dairy cow diet. LSBM source treatments in the dairy cow diet showed pH value, NH<sub>3</sub>-N concentration and total VFA concentration lower than control at all levels and incubation times ( $p < 0.05$ ). Dry matter digestibility of LSBM source treatments showed lower than control ( $p < 0.05$ ). Gas production and rumen microbial synthesis was decreased by rumen microbial fermentation for incubation times. Undegradable protein (UDP) concentration of all LSBM treatments was decreased for incubation times, and significantly higher than control ( $p < 0.05$ ).

In the experiment II compared diets of the control, LSBM Na 2%, LSBM Sol 2%, which are high performance to undegradable protein (UDP) concentration experiment I *in vitro* test, and heated treatment lignosulfonate (LSBM Heat) 2% in the dairy cow diet from four station RSCC system (4×4 Latin square). A rumen microbial fermentation characteristic was stability during 12~15 days of experimental period in all treatments. The pH value of LSBM treatments was higher than control treatment ( $p < 0.05$ ). The NH<sub>3</sub>-N concentration, VFA concentration and rumen microbial synthesis of LSBM treatments were lower than control ( $p < 0.05$ ). The undegradable protein (UDP) showed LSBM Na 2% (45.28%), LSBM Sol 2% (43.52%) and LSBM Heat 2% (43.49%) higher than control (41.55%), respectively ( $p < 0.05$ ).

Those experiments were designed to improve by-pass protein of diet and milk protein in the dairy cows. We will conduct those experiments the *in vivo* test by LSBM treatments in dairy cows diet.

**(Key words)** : Undegradable protein, Lignosulfonate, Soybean meal, *In vitro*, RSCC system)

#### 서 론

반추동물이 체내에서 직접 이용할 수 있는 단백질은 반추위내 미생물단백질, 사료단백질 그리고 내인성 단백질이 대부분을 차지하고 있다. 젖소의 생산성을 높이기 위한 단백질의 체내 흡수율 증진 방법으로는 사료내 보호단백질의 추가 공급에 의해 이루어질 수 있다. 반추가축 사료내 단백질원을 반추위내 미생물 발효로부터 보호시키기 위해 여러 가지 물리·화학적처리 방법들이 지속적으로 개발되어 왔으며, 또한 단백질원의 이용효율뿐 아니라 경제성, 안전성 그리고 산업적 이용성 등이 같이 고려되었다 (Ganesh와 Grieve,

1990). 현재 반추가축 사료단가는 2007년 대비 비육우용이 14%, 낙농사료 12% 정도로 지속적으로 상승하고 있는 상황이다. 따라서 반추가축 사료단가 절감이 절실한 상태에서 사료원 중 대두보다 가격이 20% 정도 낮은 대두박을 이용한 착유우 사료의 단백질 이용성 증진에 대한 관심이 고조되고 있다. 따라서 반추가축 사료원으로 사용되고 있는 대두와 대두박의 보호단백질 효과를 높이기 위한 열처리 (Nowak 등, 2005), formaldehyde처리 (Subuh 등, 1996), tannin처리 (Gatachew 등, 2008), ethanol처리 (Lynch 등, 1987) 그리고 lignosulfonate처리 (Neves 등, 2007)에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 이러한 처리 방법 중 pulp제조 시 sulfite

이 논문은 2007년도 중앙대학교 교내학술연구비 지원에 의한 것임

\* Corresponding author : M. B. Chang, Department of Animal Science & Technology, College of Industrial Sciences. Tel: 031-670-3029, E-mail: moonbaek@cau.ac.kr

액 부산물에서 얻어지는 lignosulfonate는 화학구조가 아주 작거나 보통 크기의 중합체로서 lignin, hemicelluloses 그리고 당이 복잡하게 연결되어있는 화학구조를 가지고 있다. 분자구조 중 sulfonate group은 다른 분자들이 chelation될 수 있는 특징을 가지고 있어 열에 안정성을 갖는 복합물을 제조할 때 사용되기도 한다. 또한 lignosulfonate는 열에 안정성을 지니고 있고, 보호막 기능 능력을 지니고 있어 현재 사료제조 공정에서 단백질 침전이나 pellet 사료 결합제로 다소 이용되고 있다. Lignosulfonate 자체는 가축에게 영양학적인 가치는 거의 없는 것으로 알려져 있으며, lignosulfonate 처리를 이용한 반추가축 사료원에 대한 보호단백질 개발물질로 활용 가능성에도 불구하고 아직 이에 대한 연구가 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 반추동물사료에 단백질 공급원으로 주로 사용되고 있는 대두박을 이용하여 lignosulfonate을 종류별 그리고 수준별 처리가 반추위내 미생물 발효 특성에서 보호단백질원으로써의 효율성을 검증하기 위하여 실시되었다.

## 재료 및 방법

### 1. Lignosulfonate 처리 대두박의 *in vitro* 반추위미생물 발효특성 (시험 I)

#### (1) 시험사료제조

*In vitro* 시험을 위한 기초 시험사료는 Table 1과 같으며, lignosulfonate soybean meal (LSBM) 시험사료는 각 4종의 lignosulfonate (sodium salt, calcium salt, desulfonate sodium salt, solution)를 각 2, 4, 8%씩 대두박에 분무 후 혼합하여 60°C dry oven에서 3일간 건조하여 LSBM을 제조하여 사용하였다 (Table 2). 모든 농후사료와 볏짚은 1-mm screen이 장착된 Wiley mill로 분쇄 후 농후사료 (0.51 g) : 볏짚 (1.19 g)의 비율을 3:7로 하여 기질로 사용하였으며 전체 13처리 3반복으로 시험이 실시되었다.

#### (2) *In vitro* 배양 방법

*In vitro* 시험을 위한 반추위 미생물 접종액의 제조는 도축장에서 착유우의 반추위 내용물을 8겹의 cheesecloth로 거른 후 39°C를 유지하여 실험실로 즉시 운반하였으며, McDougall's artificial saliva (1948) (Table 3)를 각각 1:1로 혼합 후 혐기상태를 유지하기 위해 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub> gas를 지속적으로 주입시켜 주었다. 미생물 혼합액에는 건조(볏짚, 20g/L)와 농후사료 (20g/L)를 함께 24시간 동안 39°C incubator에서 예비강화배양을 실시하였으며, 배양 후 반추위 내용물을 2,500 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취해 접종액으로 사용하였다. 배양은 150 ml serum bottle에 각 시험사료를 각 1.7g과 McDougall's artificial saliva를 100 ml씩 주입 후 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub> gas 분사와 함께 rubber stopper와 알루미늄 뚜껑을 고정장치를 이용하여 밀봉 후 주사기를 이용하여 5 ml의

Table 1. Ingredients and chemical composition of the experimental diet

Item	
<b>Ingredient composition</b>	
Corn	32.43
Wheat bran	15.00
Soybean meal	10.00
Corn gluten feed	10.00
DDGS <sup>1)</sup>	7.00
Rape seed meal	6.26
Palmkernel meal	6.00
Coconut meal	6.00
Rice polishing	5.00
Limestone	1.86
Salt	0.25
Minerals & vitamins mixture <sup>2)</sup>	0.20
<b>Chemical composition</b>	
Dry matter, %	88.78
Crude protein, %	18.14
Undegradable protein, %/CP	39.88
Ether extract, %	4.53
Crude fiber, %	6.24
Ash, %	6.01
NFE <sup>3)</sup> , %	53.86
NFC <sup>4)</sup> , %	47.77
ADF <sup>5)</sup> , %	11.23
NDF <sup>6)</sup> , %	23.54

<sup>1)</sup> DDGS : Dried Distillers Grain with Solubles, USA

<sup>2)</sup> Minerals & vitamins mixture: Vitamin A: 28,000 IU, Vitamin D<sub>3</sub>: 4,000 IU, Vitamin E: 80 IU, Mn: 80 ppm, Zn: 100 ppm, Fe: 70 ppm, Cu: 50 ppm, Co: 0.5 ppm, I: 2.0 ppm, Se: 1.0 ppm.

<sup>3)</sup> NFE : Nitrogen Free Extract

<sup>4)</sup> NFC : Non Fiber Carbohydrate

<sup>5)</sup> ADF : Acid Detergent Fiber

<sup>6)</sup> NDF : Neutral Detergent Fiber

반추위 미생물 접종액을 접종하였다. 접종 이후 39°C incubator에서 각 0, 2, 4, 6, 8, 10 그리고 12시간대까지 배양을 실시하였다.

#### (3) 조사항목 및 분석방법

모든 배양 조건은 혐기상태를 유지하면서 실시되었으며, 배양이 끝난 후 즉시 pH meter (3 Star, Orion, USA)를 이용하여 pH를 측정하였고, gas 측정장치 (Model Ab-5210, AITEC Inc., Canada)를 이용하여 발효 gas 생성량을 측정하였다. 배양이 끝난 각각의 sample들은 2,500 rpm에서 15분간 원심분리 후 상층액은 ammonia nitrogen (NH<sub>3</sub>-N) 함량, volatile fatty acid (VFA) 함량, 미생물 단백질 합성량을 측정하기 위하여 -40°C에서 냉동보관하였다. Effluent는 건물소화율, acid detergent fiber(ADF)소화율, undegradable protein (UDP) 함량을 측정하는데 이용하였다.

Table 2. Various types and treatment levels of lignosulfonated soybeanmeal (LSBM)

Items	Treatments
Control	Untreated soybean meal
Lignosulfonate-treatment	Treatment method
Na 2%	sodium salt (Sigma, 471038)
Na 4%	
Na 8%	
Ca 2%	calcium salt (Sigma, 471054)
Ca 4%	
Ca 8%	
DS 2%	desulfonate sodium salt (Sigma, 471046)
DS 4%	
DS 8%	
Sol 2%	company solution (Dura-Tek®)
Sol 4%	
Sol 8%	

Table 3. Composition of McDougall's buffer solution<sup>1)</sup>

Ingredient	Amounts (g)
NaHCO <sub>3</sub>	29.40
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.90
KCl	1.70
NaCl	1.41
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.18
CaCl <sub>2</sub>	0.14

<sup>1)</sup> Mix the first 6 chemicals 5L distilled water in volumetric and stir until dissolved, and adjust to liter volume and store. Just before use, add the CaCl<sub>2</sub>, keep at 39°C into solution until pH = 8.0

2. Rumen Simulation Continuous Culture (RSCC) system을 이용한 반추위 발효 특성에 관한 연구 (시험 II)

(1) 시험계획

본 시험은 시험 I에서 반추위 내 미생물 발효특성 검증결과 UDP 효과가 가장 높은 LSBM Na 2%, LSBM Sol 2%과 추가로 열처리 LSBM (LSBM Heat 2%)을 각 시험 기본 사료(Table 1)의 대두박을 대체하여 사용하였으며, 대조구를 포함하여 4처리 4반복(4×4 Latin square) 방법을 이용하여 시험이 실시되었다.

(2) Rumen Simulation Continuous Culture (RSCC) system

도축장에서 채취한 위액을 39°C 보온용기를 이용하여 실험실에 즉시 운반하였고, 8겹의 cheesecloth로 거른 후 각 4기의 RSCC system 발효조(500ml)에 반추위액과 artificial saliva (McDougall, 1948) (Table 3)를 50:50으로 혼합하였다. 발효조 내에 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub> gas를 지속적으로 주입하여 혐기상태를 유지하였으며, 동시에 시험사료는 31.2 g/DMI/d씩 12시간 간격으로 2번 급여하여 주었다. 발효조는 순환방식의 자동온도조절을 이용하여 39°C로 유지하

였으며, artificial saliva는 peristaltic pump를 이용하여 23.7 ml/h를 되도록 유지하였다.

(3) 시료 채취

Filtered effluent는 10 ml/d씩 분석을 위해 주사기를 이용하여 sampling하였고 mixed effluent는 얼음이 채워진 갈색 보온용기에 보관 되도록 하였다. 발효조에서의 전체 effluent의 dilution rate는 5%/h를 유지하였다. 모든 sample은 pH meter (3 Star, Orion, USA)를 이용하여 pH 측정 후 -40°C 냉동고에 보관하여 분석에 사용하였으며, 전체 배양 기간 15일 동안 중 배양 마지막 3일 동안의 sample을 이용하여 분석에 사용되었다.

(4) 조사항목 및 분석방법

시험 사료의 화학적 구성성분은 A.O.A.C(1984)의 방법을 이용하여 분석을 실시하였으며, ADF 소화율은 Van Soest 등(1991)의 방법을 이용하였고, NH<sub>3</sub>-N 농도는 Chaney와 Marbach(1962)의 방법에 따라 spectrophotometer (Spectronics 21D, Milton Roy, USA)를 이용하여 측정하였으며, VFA 함량은 Erwin 등(1961)의 방법을 이용하여 측정하였다. 미생물 단백질 함량은 Lowry 등(1951)의 방법을 이용하여 측정하였고 사료와 sample의 UDP 함량은 조단백질 자동분석기(Kjeltec 2300, FOSS, Denmark)를 이용하여 측정하였다.

(5) 통계처리

본 시험 I의 통계처리는 SAS program package (2009)의 GLM (General Linear Model)의 방법에 의해 배양기간 동안의 표준오차를 구하였고, 분산분석 후 Duncan's multiple range test와 ANOVA를 이용하여 처리간의 평균의 유의성 검정을 하였으며 (p<0.05), 시험 II는 4×4 Latin square design 분석법을 이용하여 시험 I과 같은 방법으로 유의성 검정을 실시하였다(Steel과 Torrie, 1981).

결과 및 고찰

1. Lignosulfonate 처리 대두박의 in vitro 반추위미생물 발효특성 (시험 I)

(1) pH 변화

전체 배양기간 동안 pH 수준은 6.51~7.72의 범위를 나타내었다. 모든 처리구에서 배양 0시간부터 배양 4시간까지 pH 수준은 반추위 내 적정 pH 수준까지 감소하는 경향을 나타내었고 이 후 배양 종료까지 6.50~6.91 수준을 유지하였다. 배양 6시간대 이후 대조구는 LSBM 처리구 보다 통계적으로 유의하게 낮은 pH 수준을 나타내었으며 (p<0.05), LSBM 처리구에서는 lignosulfonate 처리 수준이 증가할수록 pH 수준이 증가하는 경향을 나타내었다. 배양 8시간대 이후 LSBM 수준별 처리구 중 LSBM Sol 2%와 4% 처

리구가 유의적으로 높은 pH 수준을 나타내었으며 (p<0.05), LSBM 8% 처리구의 경우 통계적 차이는 없었으나 LSBM Sol 처리구가 다소 높은 pH 수준을 나타내었다 (Table 4). 이와 같은 결과는 대두박에 lignosulfonate 처리 농도가 증가할수록 반추위내에서 단백질의 분해속도와 비구조성탄수화물의 용해도 또는 반추위내 미생물 발효속도 감소에 의해 total VFA 함량이 낮아 배양초기 pH 수준이 다소 높은 결과를 나타낸 것으로 사료되며, 이전 *in situ* (Stern, 1984)와 *in vivo* (Windschitl와 stern, 1988) 연구와 같은 결과를 나타내었다. 특히, LSBM Sol 처리구의 경우 lignosulfonate 처리에 의한 대두박의 단백질 보호 효과 증가에 의해 반추위 내 미생물 발효특성이 더욱 감소한 것으로 사료된다. 본 *in vitro* 시험에서 LSBM 처리구가 대조구에 비해 배양후기까지 pH 수준이 지속적으로 통계적으로 유의하게 높은 결과를 나타내었는데 (p<0.05), 대두박에 대한 lignosulfonate의 coating 효과에 의해 반추위내 미생물 발효특성이 감소하였기 때문으로 사료된다.

(2) Gas 생성량 변화

Gas 생성량은 모든 처리구에서 배양 6시간대까지 gas 생성량이 서서히 증가하였으며, 배양 8시간대부터 급격하게 증가하는 경향을 나타내었다. 대조구에서 LSBM 처리군에 비해 통계적으로 유의하게 높은 결과를 나타내었으며 (p<0.05), LSBM 처리구에서는 LSBM 2% 처리군에서 배양 8시간대 이후부터 가장 높은 gas 생성량을 나타내었다 (p<0.05). 또한 배양 종료 12시간대에서는 대조구와 차이를 나타내지 않았다 (Table 5). LSBM Sol 처리구는 모든 LSBM 처리구에서 통계적으로 가장 낮은 gas 생성수준을 나타내었다 (p<0.05). 이와 같은 결과는 배양 6시간대까지 사료 내 대

두박의 lignosulfonate 처리에 의한 반추위 내에서의 단백질분해를 감소와 반추위 내 미생물 활력과 낮은 비구조성탄수화물 함량 때문에 gas 생성량이 감소한 것으로 사료된다 (Mansfield과 Stern, 1994). 또한 배양 8시간대 이후에 섬유소원 기질로 사용된 벚짇과 LSBM의 반추위내 미생물 발효시간 경과에 따라 다소 늦은 분해속도를 나타내다가, 배양 후기 lignosulfonate의 용해에 의해 빠른 속도로 반추위미생물발효가 이루어져 다량의 VFA가 생성되어 pH가 감소한 것으로 사료된다. 또한 LSBM의 농도가 높을수록 pH 수준과 비슷하게 gas 생성량 또한 다소 낮은 결과를 나타내었다.

(3) Ammonia nitrogen (NH<sub>3</sub>-N) 농도 변화

전체 배양 기간 동안의 NH<sub>3</sub>-N의 농도는 대조구가 통계적으로 유의하게 높은 결과를 나타내었다 (p<0.05). 모든 처리구에서 배양 2시간대까지 NH<sub>3</sub>-N 함량이 급격히 증가하였으며 이후 지속적으로 감소하는 경향을 나타내었다 (Table 6). LSBM 처리구에서는 LSBM Sol 처리군이 LSBM 농도와 상관없이 모든 시간대에서 가장 낮은 NH<sub>3</sub>-N 함량을 나타내었다 (p<0.05). 이와 같은 결과는 LSBM 처리 농도가 높아질수록 NH<sub>3</sub>-N 농도가 낮아지는 경향을 나타내었는데, LSBM 처리구에서 대두박에 대한 lignosulfonate 처리에 의해 물리적인 coating 효과에 의해 반추위내 미생물에 의한 단백질 분해속도가 낮아지기 때문으로 사료된다 (Veen, 1986).

(4) VFA 농도 변화

전체 배양 시간 동안의 total VFA 농도는 대조구에서 통계적으로 유의하게 높은 결과를 나타내었으며, LSBM 처리군에서는 LSBM 2% 처리구가 4%와 8% LSBM 처리구에 비해 높은 결과

Table 4. Changes of pH value of lignosulfonate treated soybean meal (LSBM) after 12hrs. incubation *in vitro* ruminal culture system

Incubation time (h)	Treatments													SEM <sup>5)</sup>	p< <sup>6)</sup>
	Control	LSBM 2%				LSBM 4%				LSBM 8%					
		LSBM DS <sup>1)</sup>	LSBM Ca <sup>2)</sup>	LSBM Na <sup>3)</sup>	LSBM Sol <sup>4)</sup>	LSBM DS	LSBM Ca	LSBM Na	LSBM Sol	LSBM DS	LSBM Ca	LSBM Na	LSBM Sol		
0	7.69	7.67	7.69	7.71	7.68	7.72	7.70	7.67	7.71	7.68	7.68	7.70	7.71	0.027	0.985
2	7.42	7.39	7.40	7.39	7.40	7.42	7.44	7.39	7.39	7.42	7.43	7.39	7.40	0.048	0.965
4	6.87 <sup>c</sup>	6.84 <sup>ab</sup>	6.82 <sup>ab</sup>	6.81 <sup>ab</sup>	6.80 <sup>b</sup>	6.86 <sup>ab</sup>	6.87 <sup>ab</sup>	6.81 <sup>b</sup>	6.88 <sup>b</sup>	6.90 <sup>a</sup>	6.90 <sup>a</sup>	6.87 <sup>ab</sup>	6.86 <sup>ab</sup>	0.045	0.026
6	6.75 <sup>c</sup>	6.78 <sup>b</sup>	6.80 <sup>ab</sup>	6.79 <sup>ab</sup>	6.79 <sup>b</sup>	6.79 <sup>b</sup>	6.83 <sup>ab</sup>	6.78 <sup>b</sup>	6.83 <sup>ab</sup>	6.83 <sup>ab</sup>	6.87 <sup>a</sup>	6.84 <sup>ab</sup>	6.82 <sup>ab</sup>	0.042	0.034
8	6.62 <sup>d</sup>	6.69 <sup>c</sup>	6.71 <sup>c</sup>	6.72 <sup>c</sup>	6.74 <sup>b</sup>	6.75 <sup>b</sup>	6.76 <sup>b</sup>	6.77 <sup>b</sup>	6.82 <sup>ab</sup>	6.90 <sup>a</sup>	6.91 <sup>a</sup>	6.89 <sup>a</sup>	6.91 <sup>a</sup>	0.037	0.043
10	6.53 <sup>d</sup>	6.65 <sup>c</sup>	6.61 <sup>c</sup>	6.64 <sup>c</sup>	6.67 <sup>b</sup>	6.69 <sup>a</sup>	6.63 <sup>a</sup>	6.65 <sup>a</sup>	6.65 <sup>a</sup>	6.68 <sup>a</sup>	6.66 <sup>a</sup>	6.67 <sup>a</sup>	6.68 <sup>a</sup>	0.042	0.037
12	6.51 <sup>e</sup>	6.53 <sup>d</sup>	6.52 <sup>d</sup>	6.54 <sup>d</sup>	6.57 <sup>c</sup>	6.64 <sup>b</sup>	6.62 <sup>b</sup>	6.63 <sup>b</sup>	6.62 <sup>b</sup>	6.61 <sup>a</sup>	6.61 <sup>a</sup>	6.60 <sup>a</sup>	6.60 <sup>a</sup>	0.038	0.027

<sup>1)</sup> LSBM DS: Lignosulfonic acid, Desulfonated sodium salt (Sigma, Co., No.68512-34-5) + Soybean meal.

<sup>2)</sup> LSBM Ca: Lignosulfonic acid calcium salt (Sigma, Co., No.8061-52-7) + Soybean meal.

<sup>3)</sup> LSBM Na: Lignosulfonic acid sodium salt (Sigma Co., No.8061-51-6) + Soybean meal.

<sup>4)</sup> LSBM Sol: Lignosulfonic acid solution.

<sup>5)</sup> SEM: Standard error of means.

<sup>6)</sup> Significant if p<0.05.

a, b, c, d, e, ab Means with different superscripts in the same row are significantly different.

Table 5. Changes of gas production of lignosulfonate treated soybean meal (LSBM) for 12 hrs. incubation time *in vitro* ruminal culture system

Incubation time (h)	Treatments													SEM <sup>5)</sup>	p< <sup>6)</sup>
	Control	LSBM 2%				LSBM 4%				LSBM 8%					
		LSBM DS <sup>1)</sup>	LSBM Ca <sup>2)</sup>	LSBM Na <sup>3)</sup>	LSBM Sol <sup>4)</sup>	LSBM DS	LSBM Ca	LSBM Na	LSBM Sol	LSBM DS	LSBM Ca	LSBM Na	LSBM Sol		
..... ml .....															
0	15.6 <sup>b</sup>	16.1 <sup>b</sup>	15.4 <sup>b</sup>	15.5 <sup>b</sup>	15.0 <sup>bc</sup>	13.3 <sup>d</sup>	14.0 <sup>c</sup>	12.2 <sup>e</sup>	12.2 <sup>e</sup>	19.7 <sup>a</sup>	19.5 <sup>a</sup>	13.3 <sup>d</sup>	18.5 <sup>a</sup>	1.115	0.046
2	23.5 <sup>a</sup>	15.9 <sup>e</sup>	20.9 <sup>b</sup>	17.8 <sup>c</sup>	17.9 <sup>c</sup>	16.5 <sup>d</sup>	17.1 <sup>d</sup>	16.3 <sup>de</sup>	16.2 <sup>de</sup>	18.1 <sup>c</sup>	19.1 <sup>bc</sup>	18.1 <sup>c</sup>	19.3 <sup>bc</sup>	2.224	0.036
4	27.4 <sup>a</sup>	27.4 <sup>a</sup>	26.2 <sup>b</sup>	25.1 <sup>c</sup>	23.0 <sup>d</sup>	24.9 <sup>c</sup>	22.4 <sup>d</sup>	19.6 <sup>e</sup>	23.0 <sup>d</sup>	26.4 <sup>b</sup>	26.9 <sup>ab</sup>	26.6 <sup>b</sup>	26.6 <sup>b</sup>	2.151	0.025
6	55.7 <sup>a</sup>	30.3 <sup>f</sup>	31.1 <sup>f</sup>	31.1 <sup>f</sup>	29.5 <sup>f</sup>	50.5 <sup>c</sup>	40.1 <sup>de</sup>	37.3 <sup>e</sup>	42.4 <sup>de</sup>	46.9 <sup>d</sup>	51.0 <sup>bc</sup>	51.7 <sup>bc</sup>	53.7 <sup>b</sup>	3.036	0.043
8	100.7 <sup>a</sup>	84.3 <sup>b</sup>	100.7 <sup>a</sup>	77.2 <sup>c</sup>	57.8 <sup>d</sup>	59.8 <sup>d</sup>	58.7 <sup>d</sup>	57.6 <sup>d</sup>	48.5 <sup>e</sup>	59.3 <sup>d</sup>	58.7 <sup>d</sup>	57.8 <sup>d</sup>	43.8 <sup>e</sup>	3.684	0.033
10	120.7 <sup>a</sup>	121.2 <sup>a</sup>	116.3 <sup>b</sup>	114.5 <sup>b</sup>	103.6 <sup>cd</sup>	105.9 <sup>c</sup>	106.7 <sup>c</sup>	104.9 <sup>c</sup>	97.6 <sup>d</sup>	105.9 <sup>c</sup>	106.7 <sup>c</sup>	104.9 <sup>c</sup>	97.6 <sup>d</sup>	3.953	0.021
12	128.8 <sup>a</sup>	126.0 <sup>a</sup>	125.3 <sup>a</sup>	127.4 <sup>a</sup>	115.9 <sup>b</sup>	110.3 <sup>c</sup>	109.0 <sup>c</sup>	107.2 <sup>c</sup>	99.2 <sup>d</sup>	109.7 <sup>c</sup>	109.5 <sup>c</sup>	109.3 <sup>c</sup>	102.5 <sup>d</sup>	5.197	0.042

<sup>1)</sup> LSBM DS: Lignosulfonic acid, Desulfonated sodium salt (Sigma, Co., No.68512-34-5) + Soybean meal.

<sup>2)</sup> LSBM Ca: Lignosulfonic acid calcium salt (Sigma, Co., No.8061-52-7) + Soybean meal.

<sup>3)</sup> LSBM Na: Lignosulfonic acid sodium salt (Sigma Co., No.8061-51-6) + Soybean meal.

<sup>4)</sup> LSBM Sol: Lignosulfonic acid solution.

<sup>5)</sup> SEM: Standard error of means.

<sup>6)</sup> Significant if p<0.05.

a, b, c, d, e, f, ab, bc, cd, de Means with different superscripts in the same row are significantly different.

Table 6. Changes of NH<sub>3</sub>-N concentration of lignosulfonate treated soybean meal (LSBM) for 12 hrs. incubation time *in vitro* ruminal culture system

Incubation time (h)	Treatments													SEM <sup>5)</sup>	p< <sup>6)</sup>
	Control	LSBM 2%				LSBM 4%				LSBM 8%					
		LSBM DS <sup>1)</sup>	LSBM Ca <sup>2)</sup>	LSBM Na <sup>3)</sup>	LSBM Sol <sup>4)</sup>	LSBM DS	LSBM Ca	LSBM Na	LSBM Sol	LSBM DS	LSBM Ca	LSBM Na	LSBM Sol		
..... mg/100ml .....															
0	31.67 <sup>c</sup>	35.35 <sup>a</sup>	35.27 <sup>a</sup>	34.49 <sup>b</sup>	34.06 <sup>b</sup>	34.14 <sup>b</sup>	34.27 <sup>b</sup>	34.22 <sup>b</sup>	34.54 <sup>b</sup>	31.58 <sup>c</sup>	31.48 <sup>c</sup>	31.95 <sup>c</sup>	31.93 <sup>c</sup>	0.121	0.037
2	48.25 <sup>a</sup>	46.64 <sup>a</sup>	45.64 <sup>ab</sup>	44.83 <sup>ab</sup>	42.64 <sup>b</sup>	41.18 <sup>b</sup>	40.21 <sup>c</sup>	43.52 <sup>b</sup>	39.17 <sup>c</sup>	41.33 <sup>b</sup>	39.10 <sup>c</sup>	41.10 <sup>b</sup>	35.83 <sup>d</sup>	2.690	0.041
4	44.13 <sup>a</sup>	42.25 <sup>ab</sup>	43.83 <sup>a</sup>	40.83 <sup>b</sup>	41.25 <sup>b</sup>	38.33 <sup>c</sup>	37.20 <sup>c</sup>	41.59 <sup>b</sup>	34.79 <sup>d</sup>	38.35 <sup>c</sup>	36.88 <sup>c</sup>	40.35 <sup>b</sup>	30.33 <sup>e</sup>	1.777	0.028
6	42.02 <sup>a</sup>	38.64 <sup>b</sup>	41.83 <sup>a</sup>	38.83 <sup>b</sup>	39.20 <sup>b</sup>	36.28 <sup>c</sup>	36.74 <sup>c</sup>	36.55 <sup>c</sup>	30.24 <sup>d</sup>	36.12 <sup>c</sup>	35.11 <sup>cd</sup>	36.35 <sup>c</sup>	28.88 <sup>d</sup>	1.829	0.046
8	39.02 <sup>a</sup>	37.64 <sup>b</sup>	37.75 <sup>b</sup>	37.70 <sup>b</sup>	35.88 <sup>c</sup>	35.86 <sup>c</sup>	37.48 <sup>b</sup>	35.74 <sup>c</sup>	28.22 <sup>d</sup>	35.35 <sup>c</sup>	34.10 <sup>c</sup>	35.35 <sup>c</sup>	27.10 <sup>d</sup>	1.973	0.043
10	37.82 <sup>a</sup>	32.97 <sup>bc</sup>	34.21 <sup>b</sup>	34.84 <sup>b</sup>	30.80 <sup>c</sup>	29.27 <sup>cd</sup>	30.76 <sup>c</sup>	30.40 <sup>c</sup>	24.21 <sup>d</sup>	30.38 <sup>c</sup>	29.60 <sup>cd</sup>	29.85 <sup>c</sup>	23.35 <sup>d</sup>	1.926	0.039
12	34.02 <sup>a</sup>	32.83 <sup>b</sup>	32.38 <sup>b</sup>	34.57 <sup>a</sup>	29.75 <sup>c</sup>	30.02 <sup>c</sup>	30.16 <sup>c</sup>	30.19 <sup>c</sup>	23.67 <sup>d</sup>	29.13 <sup>cd</sup>	29.08 <sup>cd</sup>	29.88 <sup>c</sup>	22.58 <sup>d</sup>	1.828	0.022

<sup>1)</sup> LSBM DS: Lignosulfonic acid, Desulfonated sodium salt (Sigma, Co., No.68512-34-5) + Soybean meal.

<sup>2)</sup> LSBM Ca: Lignosulfonic acid calcium salt (Sigma, Co., No.8061-52-7) + Soybean meal.

<sup>3)</sup> LSBM Na: Lignosulfonic acid sodium salt (Sigma Co., No.8061-51-6) + Soybean meal.

<sup>4)</sup> LSBM Sol: Lignosulfonic acid solution.

<sup>5)</sup> SEM: Standard error of means.

<sup>6)</sup> Significant if p<0.05.

a, b, c, d, e, ab, bc, cd Means with different superscripts in the same row are significantly different.

Table 7. Molar proportion of VFA concentration of lignosulfonate treated soybean meal (LSBM) for 12 hrs. incubation time *in vitro* ruminal culture system

Incubation time (h)	Control	2%				4%				8%				SEM <sup>5)</sup>	p< <sup>6)</sup>	
		LSBM DS <sup>1)</sup>	LSBM Ca <sup>2)</sup>	LSBM Na <sup>3)</sup>	LSBM Sol <sup>4)</sup>	LSBM DS	LSBM Ca	LSBM Na	LSBM Sol	LSBM DS	LSBM Ca	LSBM Na	LSBM Sol			
mM																
0	Acetate	60.87 <sup>ab</sup>	58.99 <sup>bc</sup>	59.45 <sup>b</sup>	59.95 <sup>b</sup>	59.47 <sup>b</sup>	61.55 <sup>a</sup>	60.28 <sup>ab</sup>	59.25 <sup>bc</sup>	59.11 <sup>bc</sup>	61.11 <sup>a</sup>	61.14 <sup>a</sup>	61.57 <sup>a</sup>	60.45 <sup>ab</sup>	1.117	0.015
	Propionate	18.96 <sup>a</sup>	18.39 <sup>b</sup>	18.64 <sup>b</sup>	18.58 <sup>b</sup>	18.61 <sup>b</sup>	19.08 <sup>a</sup>	18.80 <sup>ab</sup>	18.40 <sup>b</sup>	18.36 <sup>b</sup>	17.96 <sup>c</sup>	18.04 <sup>c</sup>	18.09 <sup>c</sup>	17.76 <sup>d</sup>	0.381	0.021
	n-Butyrate	28.00 <sup>a</sup>	26.39 <sup>c</sup>	26.62 <sup>d</sup>	26.78 <sup>cd</sup>	26.58 <sup>d</sup>	26.84 <sup>a</sup>	26.96 <sup>c</sup>	26.53 <sup>d</sup>	26.45 <sup>de</sup>	27.34 <sup>b</sup>	27.93 <sup>a</sup>	27.47 <sup>b</sup>	27.01 <sup>c</sup>	0.593	0.044
	Total VFA	112.07 <sup>e</sup>	111.75 <sup>c</sup>	112.68 <sup>d</sup>	113.64 <sup>cd</sup>	112.66 <sup>d</sup>	116.52 <sup>a</sup>	114.15 <sup>c</sup>	112.27 <sup>e</sup>	111.95 <sup>e</sup>	115.97 <sup>b</sup>	115.76 <sup>b</sup>	116.46 <sup>a</sup>	114.40 <sup>c</sup>	2.146	0.031
	A/P ratio	3.21 <sup>b</sup>	3.21 <sup>b</sup>	3.19 <sup>c</sup>	3.23 <sup>b</sup>	3.20 <sup>c</sup>	3.23 <sup>b</sup>	3.21 <sup>b</sup>	3.22 <sup>b</sup>	3.22 <sup>b</sup>	3.41 <sup>a</sup>	3.39 <sup>a</sup>	3.40 <sup>a</sup>	3.40 <sup>a</sup>	0.032	0.015
2	Acetate	74.42 <sup>a</sup>	69.71 <sup>b</sup>	69.99 <sup>b</sup>	70.49 <sup>b</sup>	69.99 <sup>b</sup>	66.38 <sup>c</sup>	66.13 <sup>c</sup>	66.61 <sup>c</sup>	66.20 <sup>c</sup>	56.33 <sup>d</sup>	56.23 <sup>d</sup>	56.45 <sup>d</sup>	56.52 <sup>d</sup>	1.871	0.028
	Propionate	20.19 <sup>a</sup>	19.46 <sup>b</sup>	19.63 <sup>b</sup>	19.62 <sup>b</sup>	19.44 <sup>b</sup>	18.68 <sup>c</sup>	18.61 <sup>c</sup>	18.73 <sup>c</sup>	18.67 <sup>c</sup>	17.52 <sup>d</sup>	17.52 <sup>d</sup>	17.70 <sup>d</sup>	17.54 <sup>d</sup>	0.610	0.033
	n-Butyrate	33.58 <sup>a</sup>	31.19 <sup>b</sup>	31.14 <sup>b</sup>	31.48 <sup>b</sup>	31.30 <sup>b</sup>	29.67 <sup>c</sup>	29.55 <sup>c</sup>	29.73 <sup>c</sup>	29.59 <sup>c</sup>	25.16 <sup>c</sup>	25.15 <sup>c</sup>	25.52 <sup>c</sup>	25.30 <sup>d</sup>	0.517	0.018
	Total VFA	141.08 <sup>a</sup>	132.09 <sup>bc</sup>	131.97 <sup>c</sup>	133.54 <sup>bc</sup>	136.51 <sup>ab</sup>	125.69 <sup>d</sup>	125.20 <sup>d</sup>	125.56 <sup>d</sup>	129.38 <sup>cd</sup>	106.92 <sup>f</sup>	106.54 <sup>f</sup>	108.19 <sup>f</sup>	117.05 <sup>e</sup>	2.039	0.021
	A/P ratio	3.68 <sup>a</sup>	3.58 <sup>b</sup>	3.57 <sup>b</sup>	3.59 <sup>b</sup>	3.60 <sup>b</sup>	3.55 <sup>c</sup>	3.55 <sup>c</sup>	3.55 <sup>c</sup>	3.55 <sup>c</sup>	3.22 <sup>d</sup>	3.21 <sup>d</sup>	3.19 <sup>d</sup>	3.22 <sup>d</sup>	0.029	0.026
4	Acetate	71.16 <sup>a</sup>	67.48 <sup>b</sup>	66.72 <sup>c</sup>	66.54 <sup>c</sup>	66.78 <sup>c</sup>	65.50 <sup>d</sup>	62.92 <sup>e</sup>	64.34 <sup>de</sup>	63.73 <sup>de</sup>	55.48 <sup>f</sup>	55.75 <sup>f</sup>	55.48 <sup>f</sup>	56.23 <sup>f</sup>	0.993	0.020
	Propionate	19.71 <sup>a</sup>	19.32 <sup>b</sup>	19.12 <sup>b</sup>	19.08 <sup>b</sup>	19.13 <sup>b</sup>	18.66 <sup>c</sup>	18.47 <sup>d</sup>	18.89 <sup>c</sup>	18.77 <sup>c</sup>	17.91 <sup>e</sup>	17.96 <sup>e</sup>	17.90 <sup>e</sup>	18.10 <sup>d</sup>	0.332	0.027
	n-Butyrate	32.14 <sup>a</sup>	29.89 <sup>b</sup>	29.84 <sup>b</sup>	29.86 <sup>b</sup>	29.86 <sup>b</sup>	28.36 <sup>c</sup>	28.17 <sup>c</sup>	28.79 <sup>c</sup>	28.50 <sup>c</sup>	24.80 <sup>e</sup>	24.93 <sup>e</sup>	24.81 <sup>e</sup>	25.14 <sup>d</sup>	0.520	0.036
	Total VFA	155.14 <sup>a</sup>	126.62 <sup>c</sup>	126.42 <sup>c</sup>	126.66 <sup>c</sup>	129.45 <sup>b</sup>	120.26 <sup>e</sup>	119.28 <sup>e</sup>	121.87 <sup>e</sup>	123.62 <sup>d</sup>	105.03 <sup>g</sup>	105.65 <sup>g</sup>	105.01 <sup>g</sup>	109.51 <sup>f</sup>	1.567	0.042
	A/P ratio	3.61 <sup>a</sup>	3.49 <sup>b</sup>	3.49 <sup>b</sup>	3.49 <sup>b</sup>	3.49 <sup>b</sup>	3.40 <sup>c</sup>	3.41 <sup>c</sup>	3.41 <sup>c</sup>	3.40 <sup>c</sup>	3.10 <sup>d</sup>	3.10 <sup>d</sup>	3.10 <sup>d</sup>	3.11 <sup>d</sup>	0.027	0.019
6	Acetate	66.86 <sup>a</sup>	61.95 <sup>b</sup>	61.49 <sup>b</sup>	62.56 <sup>b</sup>	60.95 <sup>bc</sup>	59.37 <sup>c</sup>	59.22 <sup>c</sup>	59.19 <sup>c</sup>	58.36 <sup>c</sup>	54.22 <sup>d</sup>	54.26 <sup>d</sup>	53.99 <sup>d</sup>	54.55 <sup>d</sup>	1.207	0.027
	Propionate	19.63 <sup>a</sup>	18.27 <sup>b</sup>	18.14 <sup>b</sup>	18.49 <sup>b</sup>	18.00 <sup>bc</sup>	17.97 <sup>bc</sup>	18.00 <sup>bc</sup>	18.03 <sup>bc</sup>	17.65 <sup>c</sup>	17.82 <sup>c</sup>	18.17 <sup>b</sup>	17.82 <sup>c</sup>	17.77 <sup>c</sup>	0.365	0.016
	n-Butyrate	29.44 <sup>a</sup>	27.69 <sup>b</sup>	27.48 <sup>b</sup>	27.18 <sup>bc</sup>	27.20 <sup>bc</sup>	26.70 <sup>cd</sup>	26.54 <sup>cd</sup>	26.48 <sup>d</sup>	26.13 <sup>de</sup>	24.23 <sup>e</sup>	24.19 <sup>e</sup>	24.10 <sup>e</sup>	24.39 <sup>de</sup>	0.378	0.019
	Total VFA	136.30 <sup>a</sup>	117.38 <sup>b</sup>	116.53 <sup>b</sup>	115.32 <sup>b</sup>	119.38 <sup>b</sup>	113.07 <sup>c</sup>	112.28 <sup>c</sup>	112.10 <sup>c</sup>	115.54 <sup>c</sup>	102.63 <sup>d</sup>	102.66 <sup>d</sup>	102.12 <sup>d</sup>	109.24 <sup>cd</sup>	1.529	0.024
	A/P ratio	3.41 <sup>a</sup>	3.39 <sup>a</sup>	3.39 <sup>a</sup>	3.38 <sup>a</sup>	3.39 <sup>a</sup>	3.30 <sup>b</sup>	3.29 <sup>b</sup>	3.28 <sup>b</sup>	3.31 <sup>b</sup>	3.04 <sup>c</sup>	2.99 <sup>d</sup>	3.03 <sup>c</sup>	3.07 <sup>c</sup>	0.018	0.023
8	Acetate	65.81 <sup>a</sup>	60.68 <sup>b</sup>	60.51 <sup>b</sup>	60.43 <sup>b</sup>	60.37 <sup>b</sup>	57.70 <sup>cd</sup>	57.78 <sup>cd</sup>	58.02 <sup>c</sup>	58.36 <sup>c</sup>	53.59 <sup>d</sup>	52.90 <sup>d</sup>	52.87 <sup>d</sup>	53.03 <sup>d</sup>	0.888	0.024
	Propionate	20.61 <sup>a</sup>	18.98 <sup>b</sup>	18.91 <sup>b</sup>	18.96 <sup>b</sup>	18.87 <sup>b</sup>	18.64 <sup>b</sup>	18.70 <sup>b</sup>	18.66 <sup>b</sup>	18.69 <sup>b</sup>	18.17 <sup>c</sup>	18.33 <sup>c</sup>	18.07 <sup>c</sup>	17.97 <sup>d</sup>	0.298	0.031
	n-Butyrate	29.35 <sup>a</sup>	27.14 <sup>b</sup>	27.08 <sup>b</sup>	26.97 <sup>b</sup>	26.97 <sup>b</sup>	25.80 <sup>cd</sup>	25.81 <sup>cd</sup>	25.95 <sup>c</sup>	26.07 <sup>c</sup>	23.94 <sup>d</sup>	23.64 <sup>d</sup>	23.64 <sup>d</sup>	23.72 <sup>d</sup>	0.420	0.037
	Total VFA	125.65 <sup>a</sup>	114.97 <sup>b</sup>	114.68 <sup>b</sup>	114.50 <sup>b</sup>	117.27 <sup>b</sup>	109.23 <sup>cd</sup>	109.52 <sup>c</sup>	109.87 <sup>c</sup>	114.53 <sup>c</sup>	102.35 <sup>d</sup>	102.13 <sup>d</sup>	102.97 <sup>d</sup>	113.43 <sup>c</sup>	1.683	0.036
	A/P ratio	3.19 <sup>a</sup>	3.20 <sup>a</sup>	3.20 <sup>a</sup>	3.19 <sup>a</sup>	3.20 <sup>a</sup>	3.10 <sup>b</sup>	3.09 <sup>b</sup>	3.11 <sup>b</sup>	3.12 <sup>b</sup>	2.95 <sup>bc</sup>	2.89 <sup>d</sup>	2.93 <sup>cd</sup>	2.95 <sup>bc</sup>	0.028	0.028
10	Acetate	64.28 <sup>a</sup>	59.14 <sup>c</sup>	59.52 <sup>c</sup>	59.05 <sup>c</sup>	59.14 <sup>c</sup>	56.83 <sup>d</sup>	55.79 <sup>d</sup>	55.94 <sup>d</sup>	56.81 <sup>d</sup>	61.11 <sup>b</sup>	61.14 <sup>b</sup>	61.57 <sup>b</sup>	60.45 <sup>c</sup>	0.690	0.034
	Propionate	20.58 <sup>a</sup>	19.06 <sup>bc</sup>	19.26 <sup>b</sup>	18.97 <sup>bc</sup>	18.98 <sup>bc</sup>	18.93 <sup>bc</sup>	18.57 <sup>c</sup>	18.43 <sup>c</sup>	18.69 <sup>c</sup>	17.96 <sup>d</sup>	18.04 <sup>d</sup>	18.09 <sup>d</sup>	17.76 <sup>e</sup>	0.310	0.017
	n-Butyrate	28.73 <sup>a</sup>	26.44 <sup>c</sup>	26.56 <sup>c</sup>	26.43 <sup>c</sup>	26.43 <sup>c</sup>	25.42 <sup>d</sup>	24.90 <sup>d</sup>	25.01 <sup>d</sup>	25.38 <sup>d</sup>	27.34 <sup>b</sup>	27.93 <sup>b</sup>	27.47 <sup>b</sup>	27.01 <sup>b</sup>	0.302	0.014
	Total VFA	124.71 <sup>a</sup>	122.05 <sup>b</sup>	122.77 <sup>b</sup>	121.92 <sup>b</sup>	124.97 <sup>b</sup>	112.59 <sup>c</sup>	115.60 <sup>de</sup>	115.90 <sup>de</sup>	117.61 <sup>c</sup>	115.97 <sup>de</sup>	115.76 <sup>de</sup>	116.46 <sup>c</sup>	119.40 <sup>c</sup>	1.309	0.015
	A/P ratio	3.12 <sup>b</sup>	3.10 <sup>b</sup>	3.09 <sup>bc</sup>	3.11 <sup>b</sup>	3.12 <sup>b</sup>	3.00 <sup>d</sup>	3.00 <sup>d</sup>	3.04 <sup>c</sup>	3.04 <sup>c</sup>	3.41 <sup>a</sup>	3.39 <sup>a</sup>	3.40 <sup>a</sup>	3.40 <sup>a</sup>	0.026	0.035
12	Acetate	63.37 <sup>a</sup>	59.09 <sup>b</sup>	59.02 <sup>b</sup>	58.70 <sup>b</sup>	58.61 <sup>b</sup>	55.59 <sup>d</sup>	55.57 <sup>d</sup>	55.48 <sup>d</sup>	55.83 <sup>cd</sup>	56.33 <sup>c</sup>	56.23 <sup>cd</sup>	56.45 <sup>c</sup>	56.52 <sup>c</sup>	0.941	0.026
	Propionate	21.08 <sup>a</sup>	19.67 <sup>b</sup>	19.52 <sup>bc</sup>	19.66 <sup>b</sup>	19.69 <sup>b</sup>	18.78 <sup>c</sup>	18.88 <sup>c</sup>	18.83 <sup>c</sup>	19.01 <sup>bc</sup>	17.52 <sup>d</sup>	17.52 <sup>d</sup>	17.70 <sup>d</sup>	17.54 <sup>d</sup>	0.381	0.024
	n-Butyrate	28.25 <sup>a</sup>	26.44 <sup>b</sup>	26.39 <sup>b</sup>	26.27 <sup>b</sup>	26.18 <sup>b</sup>	24.86 <sup>d</sup>	24.86 <sup>d</sup>	24.82 <sup>d</sup>	24.96 <sup>cd</sup>	25.16 <sup>c</sup>	25.15 <sup>c</sup>	25.52 <sup>c</sup>	25.30 <sup>c</sup>	0.438	0.027
	Total VFA	123.99 <sup>a</sup>	123.96 <sup>a</sup>	125.87 <sup>a</sup>	123.28 <sup>a</sup>	116.98 <sup>b</sup>	115.28 <sup>b</sup>	115.86 <sup>b</sup>	115.15 <sup>b</sup>	118.71 <sup>ab</sup>	116.92 <sup>b</sup>	116.54 <sup>b</sup>	116.99 <sup>b</sup>	121.05 <sup>ab</sup>	1.788	0.024
	A/P ratio	3.02 <sup>b</sup>	3.00 <sup>b</sup>	3.02 <sup>b</sup>	2.99 <sup>b</sup>	2.98 <sup>bc</sup>	2.96 <sup>bc</sup>	2.94 <sup>c</sup>	2.95 <sup>c</sup>	2.94 <sup>c</sup>	3.22 <sup>a</sup>	3.21 <sup>a</sup>	3.19 <sup>a</sup>	3.22 <sup>a</sup>	0.031	0.014

<sup>1)</sup> LSBM DS: Lignosulfonic acid, Desulfonated sodium salt (Sigma, Co., No.68512-34-5) + Soybean meal.

<sup>2)</sup> LSBM Ca: Lignosulfonic acid calcium salt (Sigma, Co., No.8061-52-7) + Soybean meal.

<sup>3)</sup> LSBM Na: Lignosulfonic acid sodium salt (Sigma Co., No.8061-51-6) + Soybean meal.

<sup>4)</sup> LSBM Sol: Lignosulfonic acid solution. <sup>5)</sup> SEM: Standard error of means.

<sup>6)</sup> Significant if p<0.05.

a, b, c, d, e, f, g, ab, bc, cd, de Means with different superscripts in the same row are significantly different.

를 나타내었다( $p<0.05$ ). LSBM Sol 2% 처리구의 경우 배양 2~10시간대까지 LSBM 처리구 중 가장 높은 total VFA 함량을 나타내었다. 대조구의 경우 배양 4시간대까지 total VFA 함량이 증가하다가 배양 6시간대부터 종료 시까지 서서히 감소하는 결과를 나타내었다. 그러나 대부분의 LSBM 처리구는 배양 10시간대 이후 total VFA 함량이 다시 증가하는 경향을 나타내었다(Table 7). 이와 같은 결과는 대조구에 비해 LSBM 처리구에서 lignosulfonate 처리에 의해 반추위 내 미생물 발효특성이 낮아 배양 8시간대까지 pH 수준, gas 생성량 그리고 NH<sub>3</sub>-N 함량과 일치하는 결과를 나타내었다. 배양 후기에 LSBM 처리구는 대조구에 비해서 반추위내 미생물발효속도가 다소 낮은 경향을 나타내었으나, 특히 배양 8시간대 이후 lignosulfonate의 coating 효과 감소에 의해 대두박의 반추위내 미생물발효속도가 다소 증가한 것으로 사료된다.

Acetate와 propionate의 비율 (A/P ratio)은 대조구가 배양 4시간대까지 통계적으로 유의하게 높은 결과를 나타내었다( $p<0.05$ ) (Veen, 1986). 배양 6시간대에는 대조구와 LSBM 2% 처리군이 다른 LSBM 처리군에 비해 통계적으로 유의하게 높은 결과를 나타내었다( $p<0.05$ ). 배양 4시간대 이후 2%와 4% LSBM 처리구의 A/P ratio는 배양 시간에 따라 지속적으로 감소하였고 LSBM 8% 처리구는 10시간대 증가하였다가 12시간대에 다시 감소하는 경향을 나타내었는데, LSBM 8% 처리구의 경우 대두박에 높은 lignosulfonate coating 효과가 배양 10시간대에 LSBM의 반추위 내 미생물에 의한 분해의 결과로부터 기인한 것으로 사료된다.

(5) 반추위내 미생물단백질 합성량 변화

전체 배양기간 동안 반추위내 미생물단백질 합성량은 대조구에서 통계적으로 유의하게 높은 결과를 나타내었다( $p<0.05$ ). LSBM 2% 처리구는 4%와 8% LSBM 처리구에 비해 높은 반추위 내 미생물단백질 합성량을 나타내었다( $p<0.05$ ). LSBM 처리군 중 LSBM Sol 처리구는 모든 수준에서 다소 낮은 반추위 내 미생물단백질 합성량을 나타내었으며, LSBM 수준이 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었다(Table 8).

LSBM 2% 처리군의 경우 배양시간이 증가함에 따라 NH<sub>3</sub>-N 농도 감소, total VFA 함량 증가 그리고 건물소화율 증가와 같이 대조구와 비슷한 반추위 내 미생물 발효특성의 경향을 나타내었다. 또한 반추위 내 미생물단백질 합성량은 대조구에 비해 통계적으로 낮은 경향을 나타내었으나( $p<0.05$ ), 다른 LSBM 처리군에 비해 통계적으로 높은 결과를 나타내었다( $p<0.05$ ). Lignosulfonate 처리 대두박을 이용한 *in vivo* 시험에서 반추위 내 미생물 발효과정 중 NH<sub>3</sub>-N 농도 감소와 함께 미생물 단백질 합성량도 비례적 감소하는 결과와 일치하였다(Mansfield와 Stern, 1994). 본 *in vitro* 시험에서 반추위 내 미생물단백질 합성량은 LSBM 2% 처리수준에서 가장 높은 결과를 나타내었다. 또한 LSBM 처리군의 경우 특히 배양 종료 시까지 LSBM의 coating 효과 감소에 의해 비구조성 탄수화물 함량 증가가 반추위 내 미생물단백질 합성량을 지속적으로 증가시킬 수 있었던 것으로 사료된다.

(6) 건물 및 acid detergent fiber (ADF) 소화율의 변화

건물 소화율은 모든 처리구에서 배양시간이 경과함에 따라 증가

Table 8. Changes of microbial protein synthesis of lignosulfonate treated soybean meal (LSBM) for 12hrs. incubation time *in vitro* ruminal culture system

Incubation time (h)	Treatments													SEM <sup>5)</sup>	p <sup>6)</sup>
	Control	LSBM 2%				LSBM 4%				LSBM 8%					
		LSBM DS <sup>1)</sup>	LSBM Ca <sup>2)</sup>	LSBM Na <sup>3)</sup>	LSBM Sol <sup>4)</sup>	LSBM DS	LSBM Ca	LSBM Na	LSBM Sol	LSBM DS	LSBM Ca	LSBM Na	LSBM Sol		
	..... mg/100ml .....														
0	45.56 <sup>a</sup>	45.43 <sup>a</sup>	45.35 <sup>a</sup>	45.30 <sup>a</sup>	45.29 <sup>a</sup>	45.55 <sup>a</sup>	45.30 <sup>a</sup>	45.21 <sup>a</sup>	45.23 <sup>a</sup>	45.53 <sup>a</sup>	44.26 <sup>a</sup>	45.24 <sup>a</sup>	45.36 <sup>a</sup>	0.695	0.976
2	60.03 <sup>a</sup>	51.93 <sup>cd</sup>	50.46 <sup>cd</sup>	56.83 <sup>ab</sup>	56.56 <sup>ab</sup>	48.06 <sup>d</sup>	50.83 <sup>bc</sup>	53.53 <sup>b</sup>	52.13 <sup>b</sup>	48.46 <sup>d</sup>	48.06 <sup>d</sup>	47.13 <sup>e</sup>	46.20 <sup>f</sup>	3.426	0.037
4	56.60 <sup>a</sup>	56.06 <sup>ab</sup>	54.56 <sup>ab</sup>	56.20 <sup>ab</sup>	52.90 <sup>ab</sup>	48.56 <sup>ab</sup>	49.60 <sup>ab</sup>	52.46 <sup>ab</sup>	49.13 <sup>ab</sup>	49.93 <sup>ab</sup>	52.60 <sup>ab</sup>	47.43 <sup>b</sup>	47.03 <sup>ab</sup>	5.333	0.028
6	56.79 <sup>a</sup>	56.06 <sup>ab</sup>	55.06 <sup>ab</sup>	55.07 <sup>ab</sup>	52.80 <sup>b</sup>	51.26 <sup>bc</sup>	51.36 <sup>bc</sup>	53.46 <sup>ab</sup>	50.50 <sup>c</sup>	51.03 <sup>bc</sup>	47.10 <sup>cd</sup>	46.23 <sup>cd</sup>	45.33 <sup>d</sup>	2.916	0.034
8	59.30 <sup>a</sup>	58.33 <sup>a</sup>	58.30 <sup>a</sup>	58.16 <sup>a</sup>	55.36 <sup>ab</sup>	54.50 <sup>c</sup>	50.63 <sup>de</sup>	54.73 <sup>c</sup>	52.33 <sup>d</sup>	52.46 <sup>d</sup>	54.76 <sup>b</sup>	48.63 <sup>e</sup>	47.23 <sup>f</sup>	2.950	0.041
10	61.53 <sup>a</sup>	60.73 <sup>ab</sup>	60.70 <sup>ab</sup>	60.56 <sup>ab</sup>	60.06 <sup>ab</sup>	53.33 <sup>c</sup>	52.06 <sup>e</sup>	53.20 <sup>de</sup>	52.60 <sup>c</sup>	51.83 <sup>e</sup>	54.53 <sup>b</sup>	52.03 <sup>e</sup>	50.80 <sup>e</sup>	3.090	0.036
12	64.26 <sup>a</sup>	62.40 <sup>ab</sup>	63.93 <sup>ab</sup>	62.76 <sup>ab</sup>	62.36 <sup>ab</sup>	54.26 <sup>c</sup>	58.00 <sup>b</sup>	53.86 <sup>c</sup>	52.23 <sup>e</sup>	52.43 <sup>e</sup>	55.50 <sup>d</sup>	54.20 <sup>f</sup>	52.50 <sup>e</sup>	2.321	0.034

<sup>1)</sup> LSBM DS: Lignosulfonic acid, Desulfonated sodium salt (Sigma, Co., No.68512-34-5) + Soybean meal.

<sup>2)</sup> LSBM Ca: Lignosulfonic acid calcium salt (Sigma, Co., No.8061-52-7) + Soybean meal.

<sup>3)</sup> LSBM Na: Lignosulfonic acid sodium salt (Sigma Co., No.8061-51-6) + Soybean meal.

<sup>4)</sup> LSBM Sol: Lignosulfonic acid solution.

<sup>5)</sup> SEM: Standard error of means.

<sup>6)</sup> Significant if  $p<0.05$ .

a, b, c, d, e, f, g, ab, bc, cd, de Means with different superscripts in the same row are significantly different.

하는 경향을 나타내었으며, 대조구는 배양 8시간대까지 통계적으로 유의하게 높은 건물소화율을 나타내었다 ( $p > 0.05$ ). Windschitl와 Stern (1988)의 continuous culture system을 이용한 시험에서 5% Ca-LSBM 처리구에서 대조구에 비해 건물소화율이 6% 낮아지는 결과와 일치하는 경향을 나타내었다. LSBM 2% 처리구에서 배양 8시간대에 이후 건물소화율이 급격하게 증가하여 대조구와 비슷한 건물 소화율을 나타내었으며, 4%와 8% LSBM 처리구에 비해 통계적으로 유의하게 높은 결과를 나타내었다 ( $p < 0.05$ ) (Table 9).

ADF 소화율은 대조구가 LSBM 처리군 보다 통계적으로 유의하게 높은 결과를 나타내었다 ( $p < 0.05$ ). 또한 LSBM 2% 처리군이 배양 8시간대 이후 가장 높은 ADF 소화율을 나타내었고, 특히 LSBM Sol 처리구는 각 수준별 LSBM 처리군에서 가장 낮은 결과를 나타내었다 (Table 10). 이와 같은 결과는 건물소화율 결과와 일치하며, 특히 배양 12시간대 LSBM 2% 처리구는 대조구와 ADF 소화율의 차이가 없는 결과를 나타내었다 (Windschitl와 Stern, 1988). 따라서 LSBM 2% 처리가 반추위 내 미생물 발효 특성에 미치는 영향을 최소화 할 수 있는 수준이라고 사료된다.

(8) Undegradable protein (UDP) 함량 변화

전체 배양 기간 동안 UDP 함량은 모든 LSBM 처리구에서 대조구에 비해 통계적으로 유의하게 높은 결과를 나타내었다 ( $p < 0.05$ ). LSBM 수준이 증가할수록 UDP 함량은 높아지는 경향을 나타내었으며, 특히 LSBM 8% 처리군은 모든 처리군들 중 통계적으로 가장 높은 UDP 함량을 나타내었다 ( $p < 0.05$ ). 전체 배양

시간 동안 수준별 LSBM 처리군에서 모든 LSBM Sol 처리구가 가장 높은 UDP 함량을 나타내었으며, 또한 LSBM Sol 처리구는 대조구에 비해 각각 2%, 4% 그리고 8% LSBM 처리군에서 11.18%, 11.54% 그리고 29.11%의 UDP 함량이 증가하는 결과를 나타내었으며, LSBM 처리구 중 UDP 함량 증가 비율이 가장 높은 경향을 나타내었다 (Table 11). 이와 같은 결과는 대두박에 lignosulfonate 처리가 대두박의 coating 효과와 LSBM 제조 시 열처리효과가 대두박의 단백질 분해가 억제될 증가시켰기 때문에 사료된다 (Chalupa, 1975; Windschitl와 Stern, 1988; Mansfield와 Stern, 1994).

2. Rumen simulation continuous culture (RSCC) system 을 이용한 lignosulfonate 처리 대두박의 반추위 내 미생물 발효특성 (시험 II)

(1) pH 변화

전체 배양기간 동안 pH는 6.76~6.97로 반추위 내 적정 수준을 유지하였으며, 모든 처리구에서 배양 10일까지 불규칙적인 발효 적응기간 중의 pH 수준을 나타내었으나 이후 안정된 수준을 유지하였다 (Fig. 1). 배양 마지막 3일 동안의 평균 pH 수준은 대조구에서 6.76으로 통계적으로 유의하게 낮은 수준을 나타내었으며 ( $p < 0.05$ ), LSBM 처리구에서는 LSBM Heat 2% 처리구에 6.82로 통계적으로 유의하게 낮은 pH 수준을 유지하였다. 이와 같은 결과는 *in vitro* 시험에서 배양 8시간대 이후 LSBM 처리구의 pH

Table 9. Changes of dry matter digestibility of lignosulfonate treated soybean meal (LSBM) for 12hrs. incubation time *in vitro* ruminal culture system

Incubation time (h)	Treatments													SEM <sup>5)</sup>	p <sup>6)</sup>
	Control	LSBM 2%				LSBM 4%				LSBM 8%					
		LSBM DS <sup>1)</sup>	LSBM Ca <sup>2)</sup>	LSBM Na <sup>3)</sup>	LSBM Sol <sup>4)</sup>	LSBM DS	LSBM Ca	LSBM Na	LSBM Sol	LSBM DS	LSBM Ca	LSBM Na	LSBM Sol		
.....%															
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	24.03 <sup>a</sup>	18.78 <sup>f</sup>	17.02 <sup>d</sup>	17.80 <sup>c</sup>	16.80 <sup>d</sup>	22.40 <sup>a</sup>	19.32 <sup>bc</sup>	20.21 <sup>b</sup>	13.47 <sup>e</sup>	17.27 <sup>c</sup>	19.02 <sup>bc</sup>	17.37 <sup>c</sup>	17.70 <sup>c</sup>	0.974	0.028
4	29.38 <sup>a</sup>	17.96 <sup>f</sup>	18.46 <sup>f</sup>	23.26 <sup>c</sup>	17.06 <sup>f</sup>	28.40 <sup>ab</sup>	27.72 <sup>b</sup>	23.78 <sup>c</sup>	22.39 <sup>d</sup>	19.06 <sup>ef</sup>	20.71 <sup>e</sup>	27.71 <sup>b</sup>	26.00 <sup>b</sup>	2.153	0.032
6	35.96 <sup>a</sup>	19.72 <sup>f</sup>	21.76 <sup>e</sup>	25.90 <sup>c</sup>	19.30 <sup>f</sup>	31.57 <sup>b</sup>	34.72 <sup>ab</sup>	35.19 <sup>a</sup>	24.08 <sup>d</sup>	22.56 <sup>e</sup>	25.40 <sup>c</sup>	34.10 <sup>b</sup>	34.96 <sup>ab</sup>	1.740	0.021
8	39.06 <sup>a</sup>	33.11 <sup>d</sup>	36.56 <sup>c</sup>	38.42 <sup>ab</sup>	35.07 <sup>c</sup>	32.26 <sup>d</sup>	27.21 <sup>e</sup>	37.98 <sup>b</sup>	27.90 <sup>e</sup>	24.38 <sup>f</sup>	25.79 <sup>ef</sup>	24.69 <sup>f</sup>	22.30 <sup>g</sup>	1.005	0.019
10	40.35 <sup>a</sup>	39.73 <sup>a</sup>	39.61 <sup>a</sup>	40.04 <sup>a</sup>	39.74 <sup>a</sup>	34.80 <sup>c</sup>	32.18 <sup>c</sup>	37.92 <sup>b</sup>	29.62 <sup>d</sup>	25.19 <sup>fg</sup>	28.36 <sup>e</sup>	25.88 <sup>f</sup>	23.75 <sup>g</sup>	0.891	0.037
12	44.75 <sup>a</sup>	44.33 <sup>a</sup>	44.26 <sup>a</sup>	44.62 <sup>a</sup>	44.02 <sup>a</sup>	38.83 <sup>c</sup>	36.02 <sup>d</sup>	41.35 <sup>b</sup>	35.37 <sup>d</sup>	27.91 <sup>f</sup>	31.59 <sup>e</sup>	30.24 <sup>e</sup>	25.46 <sup>g</sup>	0.997	0.042

<sup>1)</sup> LSBM DS: Lignosulfonic acid, Desulfonated sodium salt (Sigma, Co., No.68512-34-5) + Soybean meal.

<sup>2)</sup> LSBM Ca: Lignosulfonic acid calcium salt (Sigma, Co., No.8061-52-7) + Soybean meal.

<sup>3)</sup> LSBM Na: Lignosulfonic acid sodium salt (Sigma Co., No.8061-51-6) + Soybean meal.

<sup>4)</sup> LSBM Sol: Lignosulfonic acid solution.

<sup>5)</sup> SEM: Standard error of means.

<sup>6)</sup> Significant if  $p < 0.05$ .

a, b, c, d, e, f, g ab, bc, ef, fg Means with different superscripts in the same row are significantly different.



Table 10. Changes of acid detergent fiber digestibility of lignosulfonate treated soybean meal (LSBM) for 12hrs. incubation time *in vitro* ruminal culture system

Incubation time (h)	Treatments													SEM <sup>5)</sup>	p< <sup>6)</sup>		
	Control	LSBM 2%				LSBM 4%				LSBM 8%							
		LSBM DS <sup>1)</sup>	LSBM Ca <sup>2)</sup>	LSBM Na <sup>3)</sup>	LSBM Sol <sup>4)</sup>	LSBM DS	LSBM Ca	LSBM Na	LSBM Sol	LSBM DS	LSBM Ca	LSBM Na	LSBM Sol				
..... % .....																	
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	18.56 <sup>d</sup>	21.72 <sup>c</sup>	23.50 <sup>b</sup>	25.24 <sup>a</sup>	21.89 <sup>c</sup>	21.24 <sup>c</sup>	22.04 <sup>bc</sup>	18.65 <sup>d</sup>	21.66 <sup>c</sup>	21.24 <sup>c</sup>	14.54 <sup>f</sup>	19.40 <sup>d</sup>	15.76 <sup>e</sup>	1.494	0.028		
4	22.07 <sup>de</sup>	22.38 <sup>d</sup>	24.49 <sup>c</sup>	25.64 <sup>c</sup>	22.84 <sup>d</sup>	22.20 <sup>d</sup>	22.41 <sup>d</sup>	29.08 <sup>a</sup>	21.87 <sup>de</sup>	22.20 <sup>d</sup>	27.11 <sup>b</sup>	27.32 <sup>b</sup>	20.41 <sup>e</sup>	1.400	0.031		
6	28.59 <sup>b</sup>	23.40 <sup>f</sup>	24.81 <sup>c</sup>	27.57 <sup>c</sup>	24.76 <sup>e</sup>	26.08 <sup>d</sup>	23.95 <sup>ef</sup>	29.73 <sup>a</sup>	23.62 <sup>f</sup>	26.08 <sup>d</sup>	25.76 <sup>de</sup>	22.48 <sup>g</sup>	20.57 <sup>h</sup>	1.581	0.032		
8	41.88 <sup>a</sup>	34.03 <sup>d</sup>	38.05 <sup>b</sup>	38.04 <sup>b</sup>	35.20 <sup>cd</sup>	36.73 <sup>c</sup>	36.25 <sup>c</sup>	35.49 <sup>cd</sup>	31.47 <sup>f</sup>	36.73 <sup>c</sup>	36.38 <sup>c</sup>	33.94 <sup>d</sup>	32.25 <sup>e</sup>	1.641	0.028		
10	53.31 <sup>a</sup>	48.53 <sup>c</sup>	49.34 <sup>b</sup>	48.56 <sup>c</sup>	47.75 <sup>d</sup>	48.25 <sup>c</sup>	46.93 <sup>d</sup>	48.84 <sup>bc</sup>	44.85 <sup>bc</sup>	48.25 <sup>c</sup>	49.09 <sup>b</sup>	43.82 <sup>f</sup>	44.98 <sup>e</sup>	1.648	0.024		
12	54.09 <sup>a</sup>	53.96 <sup>a</sup>	54.05 <sup>a</sup>	54.03 <sup>a</sup>	53.88 <sup>a</sup>	49.72 <sup>b</sup>	53.62 <sup>a</sup>	49.75 <sup>b</sup>	40.94 <sup>e</sup>	49.72 <sup>b</sup>	50.15 <sup>a</sup>	47.51 <sup>c</sup>	45.61 <sup>d</sup>	1.622	0.026		

<sup>1)</sup> LSBM DS: Lignosulfonic acid, Desulfonated sodium salt (Sigma, Co., No.68512-34-5) + Soybean meal.

<sup>2)</sup> LSBM Ca: Lignosulfonic acid calcium salt (Sigma, Co., No.8061-52-7) + Soybean meal.

<sup>3)</sup> LSBM Na: Lignosulfonic acid sodium salt (Sigma Co., No.8061-51-6) + Soybean meal.

<sup>4)</sup> LSBM Sol: Lignosulfonic acid solution.

<sup>5)</sup> SEM: Standard error of means.

<sup>6)</sup> Significant if p<0.05.

a, b, c, d, e, f, g, h, bc, cd, de, ef Means with different superscripts in the same row are significantly different.

Table 11. Changes of undegradable protein of lignosulfonate treated soybean meal (LSBM) for 12hrs. incubation time *in vitro* ruminal culture system

Incubation time (h)	Treatments													SEM <sup>5)</sup>	p< <sup>6)</sup>
	Control	LSBM 2%				LSBM 4%				LSBM 8%					
		LSBM DS <sup>1)</sup>	LSBM Ca <sup>2)</sup>	LSBM Na <sup>3)</sup>	LSBM Sol <sup>4)</sup>	LSBM DS	LSBM Ca	LSBM Na	LSBM Sol	LSBM DS	LSBM Ca	LSBM Na	LSBM Sol		
..... % .....															
0	9.70 <sup>f</sup>	10.19 <sup>e</sup>	11.09 <sup>c</sup>	10.97 <sup>c</sup>	11.13 <sup>c</sup>	10.38 <sup>d</sup>	10.51 <sup>d</sup>	10.50 <sup>d</sup>	10.75 <sup>cd</sup>	12.63 <sup>b</sup>	13.00 <sup>ab</sup>	13.26 <sup>a</sup>	13.64 <sup>a</sup>	0.248	0.018
2	9.39 <sup>e</sup>	10.07 <sup>d</sup>	10.32 <sup>c</sup>	10.76 <sup>c</sup>	10.86 <sup>c</sup>	10.38 <sup>c</sup>	10.16 <sup>d</sup>	10.34 <sup>c</sup>	10.39 <sup>c</sup>	12.34 <sup>b</sup>	12.63 <sup>b</sup>	13.02 <sup>ab</sup>	13.40 <sup>a</sup>	0.196	0.021
4	9.02 <sup>e</sup>	10.07 <sup>c</sup>	10.10 <sup>c</sup>	9.94 <sup>cd</sup>	10.11 <sup>c</sup>	10.03 <sup>c</sup>	10.14 <sup>c</sup>	9.89 <sup>d</sup>	10.17 <sup>c</sup>	12.30 <sup>b</sup>	11.94 <sup>b</sup>	12.49 <sup>ab</sup>	12.79 <sup>a</sup>	0.162	0.026
6	8.83 <sup>f</sup>	9.73 <sup>e</sup>	9.52 <sup>e</sup>	9.85 <sup>de</sup>	10.02 <sup>d</sup>	9.97 <sup>d</sup>	10.05 <sup>d</sup>	9.54 <sup>e</sup>	10.09 <sup>d</sup>	11.93 <sup>b</sup>	11.64 <sup>c</sup>	11.93 <sup>b</sup>	12.66 <sup>a</sup>	0.262	0.031
8	8.79 <sup>f</sup>	9.24 <sup>de</sup>	9.18 <sup>e</sup>	9.35 <sup>d</sup>	9.61 <sup>cd</sup>	9.48 <sup>d</sup>	9.42 <sup>d</sup>	9.44 <sup>d</sup>	9.94 <sup>c</sup>	11.52 <sup>a</sup>	11.39 <sup>b</sup>	11.43 <sup>b</sup>	12.45 <sup>a</sup>	0.147	0.035
10	8.57 <sup>f</sup>	8.93 <sup>e</sup>	8.89 <sup>e</sup>	9.23 <sup>d</sup>	9.54 <sup>c</sup>	9.44 <sup>cd</sup>	9.29 <sup>cd</sup>	9.28 <sup>cd</sup>	9.82 <sup>c</sup>	11.35 <sup>ab</sup>	11.18 <sup>b</sup>	11.12 <sup>b</sup>	11.90 <sup>a</sup>	0.115	0.041
12	8.32 <sup>f</sup>	8.74 <sup>e</sup>	8.74 <sup>e</sup>	9.02 <sup>d</sup>	9.23 <sup>cd</sup>	9.01 <sup>d</sup>	9.15 <sup>d</sup>	9.11 <sup>d</sup>	9.63 <sup>c</sup>	11.27 <sup>a</sup>	11.03 <sup>b</sup>	11.06 <sup>b</sup>	11.49 <sup>a</sup>	0.210	0.038

<sup>1)</sup> LSBM DS: Lignosulfonic acid, Desulfonated sodium salt (Sigma, Co., No.68512-34-5) + Soybean meal.

<sup>2)</sup> LSBM Ca: Lignosulfonic acid calcium salt (Sigma, Co., No.8061-52-7) + Soybean meal.

<sup>3)</sup> LSBM Na: Lignosulfonic acid sodium salt (Sigma Co., No.8061-51-6) + Soybean meal.

<sup>4)</sup> LSBM Sol: Lignosulfonic acid solution.

<sup>5)</sup> SEM: Standard error of means.

<sup>6)</sup> Significant if p<0.05.

a, b, c, d, e, f, ab, cd, de, ef Means with different superscripts in the same row are significantly different

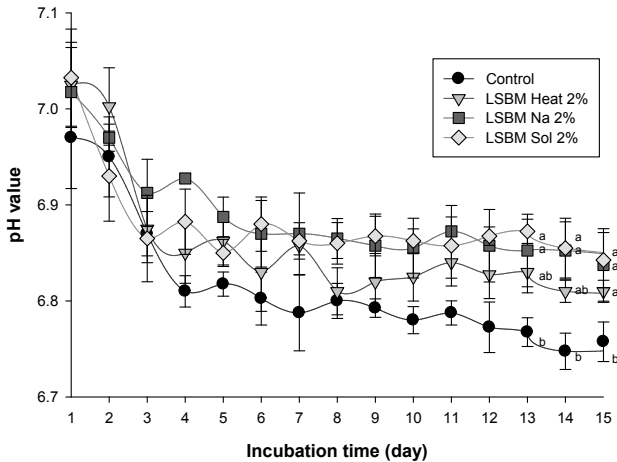


Fig. 1. Change of pH value on filtered effluents of lignosulfonated soybean meal during 15 days incubation period by rumen simulation continuous culture system. Error bars indicate SEM (n=4).

수준은 대조구와 비슷하거나 낮은 수준을 나타낸 결과와 차이를 나타내는데, RSCC system을 이용한 시험에서 12시간 간격의 시험사료 공급과 발효조 내 mixed effluent의 dilution rate (5%/h)에 의해 발효조 내 사료의 잔존 시간이 *in vitro* 시험에 비하여 짧았기 때문에 시험사료 공급 후 12시간대까지 LSBM 처리구가 높은 pH 수준을 유지한 것으로 사료된다.

(2) NH<sub>3</sub>-N 농도 변화

배양 안정화 기간 10일 이후, 배양 마지막 3일 동안의 각각의 대조구와 LSBM Heat 2%, LSBM Na 2% 그리고 LSBM Sol 2% 처리구의 평균 NH<sub>3</sub>-N 농도는 11.69, 10.69, 10.66 그리고 10.56 mg/100 ml로 LSBM 처리구가 대조구에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 결과를 나타내었으며 (p<0.05) (Fig. 2), LSBM 처리구에서는 농도 차이를 나타내지 않았다. 이와 같은 결과는 *in vitro* 시험에서 배양 대두박에 lignosulfonate 처리 수준이 증가할수록 NH<sub>3</sub>-N 농도가 감소하는 결과와 일치하였는데, 대두박에 대한 lignosulfonate 처리가 화학적인 효과에 의해 반추위 내 미생물 발효 특성이 감소한 것으로 사료된다. 또한, RSCC system을 이용하여 사료 내 비구조성탄수화물과 분해성 단백질의 함량에 따른 반추위내 미생물단백질 합성량에 대한 시험에서 사료내 분해성단백질함량이 감소함에 따라 NH<sub>3</sub>-N 함량이 동시에 감소하는 경향을 나타내며 (Mansfield 등, 1994), LSBM Ca 처리 시험에서 분해성 단백질 함량 감소에 의해 NH<sub>3</sub>-N 함량이 75% 감소하는 결과와 일치하였다 (Windschitl와 Stern, 1988).

(3) VFA 농도 변화

배양 마지막 3일 동안의 각각의 대조구, LSBM Heat 2%, LSBM Na 2% 그리고 LSBM Sol 2% 처리구의 각 평균 total

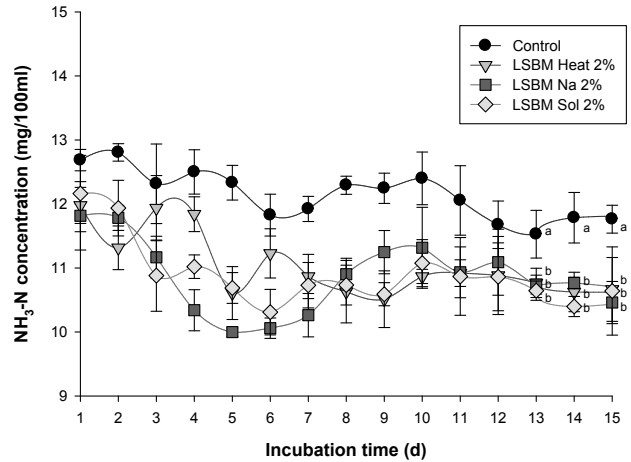


Fig. 2. NH<sub>3</sub>-N concentration of filtered effluents after incubation with each lignosulfonated soybean meal on rumen simulation continuous culture system. Error bars indicate SEM (n=4).

VFA 농도는 각각 72.47, 70.96, 71.0 그리고 69.75 mM로 대조구가 LSBM 처리구 보다 통계적으로 유의하게 높은 결과를 나타내었다 (p<0.05). 또한 A/P ratio는 대조구가 3.19로 LSBM 처리구에 비해 통계적으로 유의하게 낮은 결과를 나타내었다 (p<0.05) (Table 12). 이와 같은 결과는 *in vitro* 시험에서 LSBM 처리구가 대조구에 비해 propionate 농도가 배양 시간이 지남에 따라 높아지는 결과와 일치하였으며, RSCC system에서 사료 공급 후 12시간 동안 대두박의 lignosulfonate 처리에 의한 효과에 의해 NH<sub>3</sub>-N 농도 감소 및 비구조성탄수화물 함량 감소에 의한 섬유소 분해 미생물의 함량이 대조구에 비해 다소 낮았기 때문으로 사료된다. 또한, lignosulfonate 처리 대두박의 반추위내에서 분해성 단백질 함량 감소에 의해 감소는 total VFA의 발생량 감소와 A/P ratio가 높은 결과와 일치 하였다 (Mansfield, Endres와 Stern, 1994 Windschitl와 Stern, 1988).

(4) 반추위 미생물 단백질 합성량의 변화

안정화 기간후 연속배양 마지막 3일 동안의 반추위 내 미생물 단백질 합성량은, 대조구와 LSBM Heat 2%, LSBM Na 2% 그리고 LSBM Sol 2% 처리구에서 각각 103.10, 98.35, 93.72 그리고 100.17 mg/100 mL로 대조구에서 높은 결과를 나타내었다 (p<0.05) (Fig. 3). 이러한 결과는 대두박에 대한 lignosulfonate 처리가 반추위 내 미생물 발효특성 감소에 의해 미생물 단백질의 합성량이 감소된 것으로 사료되며, 사료 내 LSBM 처리는 분해성 단백질 함량 감소에 의해 반추위내에서 NH<sub>3</sub>-N 함량이 감소하여 미생물단백질합성량이 감소한다는 시험결과와 일치하였다 (Mansfield, Endres와 Stern, 1994 Windschitl와 Stern, 1988, Reynal와 Broderick, 2005). 또한, *in vitro* 시험에서 배양 10시간대 이후 LSBM 4%와 8% 처리구에서 미생물단백질 합성량이 LSBM 2% 처리구에서 다른 LSBM 처리구에 비해 배양 후기에 증가한 결과

Table 12. VFA concentration and Acetate / Propionate (A/P) ratio of mixed effluents after incubation with each lignosulfonated soybean meal on rumen simulation continuous culture system

Items	Incubation Time (Days)									SEM <sup>4)</sup>	p< <sup>5)</sup>
	1	3	5	7	9	11	13	14	15		
..... mM .....											
Control											
Acetate	43.87 <sup>a</sup>	42.83 <sup>a</sup>	40.78 <sup>b</sup>	38.07 <sup>c</sup>	37.14 <sup>c</sup>	36.44 <sup>c</sup>	37.00 <sup>c</sup>	37.17 <sup>c</sup>	37.42 <sup>c</sup>	1.238	0.031
Propionate	19.77 <sup>a</sup>	17.80 <sup>b</sup>	16.83 <sup>c</sup>	13.85 <sup>d</sup>	13.41 <sup>de</sup>	12.60 <sup>ef</sup>	11.85 <sup>fg</sup>	11.45 <sup>g</sup>	11.73 <sup>fg</sup>	0.642	0.025
n-Butyrate	18.47 <sup>a</sup>	18.09 <sup>a</sup>	17.11 <sup>b</sup>	16.25 <sup>c</sup>	15.56 <sup>cd</sup>	15.31 <sup>d</sup>	15.31 <sup>d</sup>	15.62 <sup>cd</sup>	15.72 <sup>cd</sup>	0.534	0.034
Total VFA	85.43 <sup>a</sup>	83.90 <sup>a</sup>	79.37 <sup>b</sup>	74.20 <sup>c</sup>	72.25 <sup>c</sup>	70.88 <sup>c</sup>	72.13 <sup>c</sup>	72.39 <sup>c</sup>	72.88 <sup>c</sup>	2.564	0.015
A/P ratio	2.23 <sup>d</sup>	2.41 <sup>c</sup>	2.43 <sup>c</sup>	2.75 <sup>b</sup>	2.77 <sup>b</sup>	2.90 <sup>b</sup>	3.12 <sup>a</sup>	3.25 <sup>a</sup>	3.19 <sup>a</sup>	0.096	0.019
LSBM Heat 2% <sup>1)</sup>											
Acetate	44.31 <sup>a</sup>	42.34 <sup>b</sup>	40.14 <sup>c</sup>	37.34 <sup>d</sup>	36.60 <sup>d</sup>	36.32 <sup>d</sup>	36.29 <sup>d</sup>	36.62 <sup>d</sup>	36.49 <sup>d</sup>	0.963	0.018
Propionate	19.56 <sup>a</sup>	17.24 <sup>b</sup>	14.95 <sup>c</sup>	12.55 <sup>d</sup>	12.27 <sup>d</sup>	11.23 <sup>e</sup>	11.06 <sup>e</sup>	11.00 <sup>e</sup>	11.04 <sup>c</sup>	0.567	0.024
n-Butyrate	18.61 <sup>a</sup>	17.79 <sup>b</sup>	16.86 <sup>c</sup>	15.66 <sup>d</sup>	15.37 <sup>d</sup>	15.26 <sup>d</sup>	15.24 <sup>d</sup>	15.37 <sup>d</sup>	15.55 <sup>d</sup>	0.463	0.026
Total VFA	86.26 <sup>a</sup>	82.42 <sup>b</sup>	78.12 <sup>c</sup>	72.64 <sup>d</sup>	71.20 <sup>d</sup>	70.62 <sup>d</sup>	70.61 <sup>d</sup>	71.29 <sup>d</sup>	71.00 <sup>d</sup>	1.876	0.035
A/P ratio	2.27 <sup>e</sup>	2.46 <sup>d</sup>	2.69 <sup>e</sup>	2.98 <sup>b</sup>	2.99 <sup>b</sup>	3.24 <sup>a</sup>	3.28 <sup>a</sup>	3.33 <sup>a</sup>	3.31 <sup>a</sup>	0.068	0.018
LSBM Na 2% <sup>2)</sup>											
Acetate	44.16 <sup>a</sup>	42.18 <sup>b</sup>	39.07 <sup>c</sup>	36.81 <sup>d</sup>	36.17 <sup>d</sup>	36.00 <sup>d</sup>	35.83 <sup>d</sup>	35.66 <sup>d</sup>	36.10 <sup>d</sup>	0.715	0.035
Propionate	19.72 <sup>a</sup>	17.64 <sup>b</sup>	14.53 <sup>c</sup>	12.38 <sup>d</sup>	11.57 <sup>e</sup>	11.03 <sup>f</sup>	10.63 <sup>fg</sup>	10.41 <sup>g</sup>	10.74 <sup>fg</sup>	0.360	0.032
n-Butyrate	17.79 <sup>a</sup>	17.71 <sup>a</sup>	16.41 <sup>b</sup>	15.70 <sup>bc</sup>	15.22 <sup>c</sup>	15.14 <sup>c</sup>	15.04 <sup>c</sup>	14.96 <sup>c</sup>	15.14 <sup>c</sup>	0.603	0.034
Total VFA	85.92 <sup>a</sup>	82.17 <sup>b</sup>	76.06 <sup>c</sup>	71.65 <sup>d</sup>	70.40 <sup>de</sup>	70.12 <sup>de</sup>	69.71 <sup>de</sup>	69.36 <sup>e</sup>	70.18 <sup>de</sup>	1.396	0.037
A/P ratio	2.24 <sup>h</sup>	2.39 <sup>g</sup>	2.69 <sup>f</sup>	2.97 <sup>e</sup>	3.13 <sup>d</sup>	3.26 <sup>c</sup>	3.37 <sup>b</sup>	3.43 <sup>a</sup>	3.36 <sup>b</sup>	0.036	0.034
LSBM Sol 2% <sup>3)</sup>											
Acetate	44.21 <sup>a</sup>	42.30 <sup>b</sup>	40.42 <sup>c</sup>	37.22 <sup>d</sup>	36.69 <sup>de</sup>	35.99 <sup>de</sup>	35.89 <sup>e</sup>	36.17 <sup>de</sup>	36.09 <sup>de</sup>	0.781	0.025
Propionate	19.67 <sup>a</sup>	17.03 <sup>b</sup>	14.92 <sup>c</sup>	12.96 <sup>d</sup>	11.96 <sup>e</sup>	11.57 <sup>ef</sup>	11.24 <sup>ef</sup>	11.21 <sup>f</sup>	11.04 <sup>f</sup>	0.474	0.018
n-Butyrate	18.55 <sup>a</sup>	17.77 <sup>b</sup>	16.96 <sup>c</sup>	15.62 <sup>d</sup>	15.42 <sup>de</sup>	15.14 <sup>de</sup>	15.09 <sup>e</sup>	15.18 <sup>de</sup>	15.14 <sup>de</sup>	0.316	0.038
Total VFA	85.95 <sup>a</sup>	82.37 <sup>b</sup>	78.63 <sup>c</sup>	72.43 <sup>d</sup>	71.43 <sup>de</sup>	70.08 <sup>de</sup>	69.82 <sup>e</sup>	70.31 <sup>de</sup>	70.14 <sup>de</sup>	1.536	0.037
A/P ratio	2.25 <sup>g</sup>	2.49 <sup>f</sup>	2.71 <sup>e</sup>	2.87 <sup>d</sup>	3.07 <sup>c</sup>	3.11 <sup>bc</sup>	3.19 <sup>ab</sup>	3.23 <sup>a</sup>	3.27 <sup>a</sup>	0.058	0.031

<sup>1)</sup> LSBM Heat: Lignosulfonic acid solution + Soybean meal heated for 3days at 60 °C

<sup>2)</sup> LSBM Na: Lignosulfonic acid sodium salt (Sigma Co., No.8061-51-6) + Soybean meal.

<sup>3)</sup> LSBM Sol: Lignosulfonic acid solution.

<sup>4)</sup> SEM: Standard error of means.

<sup>5)</sup> Significant if p<0.05.

a, b, c, d, e, f, g, ab, bc, cd, de, ef, fg Means with different superscripts in the same row are significantly different.

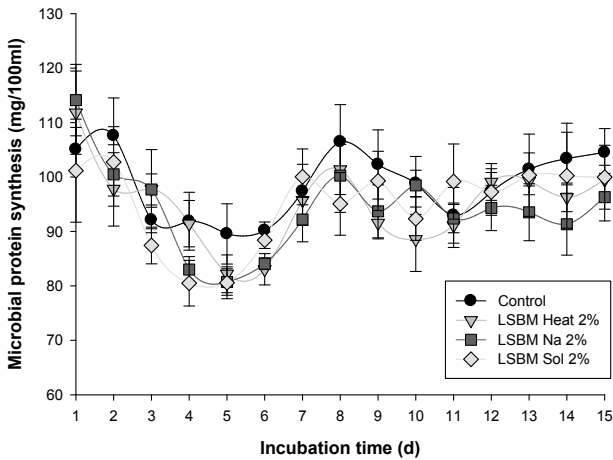


Fig. 3. Rumen microbial protein synthesis of mixed effluent after incubation with each lignosulfonated soybean meal on rumen simulation continuous culture system. Error bars indicate SEM (n=4).

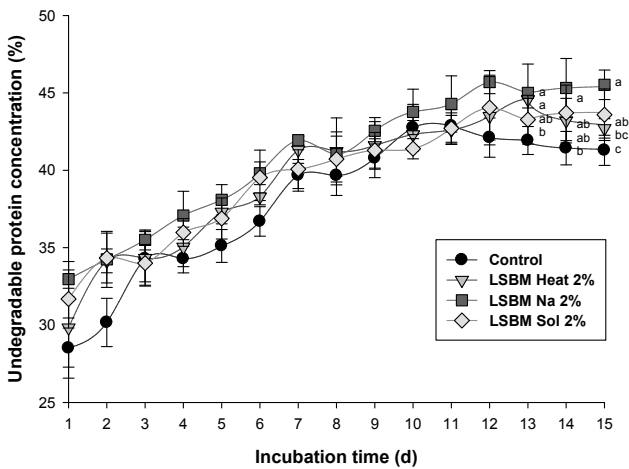


Fig. 4. Undegradable protein concentration of mixed effluent after incubation with each lignosulfonated soybean meal on rumen simulation continuous culture system. Error bars indicate SEM (n=4).

와 일치하였다.

(5) UDP 함량 변화

UDP의 함량은 배양 시작 후 적응기간까지는 배양기간과 비례하여 증가하는 경향을 나타내었고, 배양 12일부터는 연속 배양조건 안정화로 UDP 함량이 표준화되는 결과를 나타내었다. 각각 대조구, LSBM Heat 2%, LSBM Na 2% 그리고 LSBM Sol 2%의 배양 마지막 3일간의 평균 UDP 함량은 각각 41.55, 43.49, 45.28 그리고 43.52%로 LSBM 처리구가 대조구에 비해 유의하게 높은

경향을 나타내었다 ( $p < 0.05$ ). 또한 LSBM 처리구에서는 LSBM Sol 2% 처리구에서 UDP 함량이 통계적으로 유의하게 높은 결과를 나타내었다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4). 이와 같은 결과는 *in vitro* 시험 결과와 동일하게 LSBM Na 2% 처리구가 가장 높은 UDP의 함량을 나타낸 결과 일치하였으며, lignosulfonate의 사료 내 단백질 coating 작용과 대두박의 열처리에 의한 Maillard reaction이 질소의 이용율을 증가시켜 (Chalupa, 1975) 반추위 및 하부장기의 UDP 이용효율을 증진시킨 것으로 사료된다 (Atwal 등, 1995; Lee 등, 1997 Mansfield와 Stern, 1994).

결론적으로 *in vitro*와 RSCC system을 이용한 시험에서 UDP 함량은 LSBM 처리구에서 증가하는 경향을 나타내었고, 또한 lignosulfonate 처리 수준에 따라 증가하는 결과를 나타내었다. 이와 같은 결과는 lignosulfonate와 열처리에 의한 물리·화학적 효과로 인하여 반추위내에서 대두박의 반추위내 미생물에 의한 단백질 분해율과 반추위내에서 용해도를 저해 시킨 결과로 사료된다. LSBM 처리군 중 건물소화율과 반추위 내 미생물단백질 합성량은 LSBM 2% 처리구에서 가장 높은 결과를 나타내어 대조구에 비해 반추위내 미생물발효 특성에 비슷한 결과를 나타내었다. 따라서 추후 유우를 이용한 *in vivo* 시험에서 LSBM 2% 처리 급여사료에 대한 유단백질 증진효과에 대한 연구가 필요하다고 하겠다.

요 약

본 연구는 반추가축에 급여되는 사료원 중 종류별, 수준별 lignosulfonate 처리 대두박의 반추위 내 undegradable protein (UDP) 효율을 알아보기 위하여 실험 I에서 전체 4종의 lignosulfonate (Desulfonated, Na, Ca, Solution)를 각각 수준별 (2, 4, 8%)로 처리하여 전체 12종의 lignosulfonated soybean meal (LSBM)에 대한 반추위 내 미생물 발효 특성의 미치는 영향을 알아보기 위해 *in vitro* 시험이 실시되었다. 실험 II에서는 실험 I에서 대두박의 단백질 보호 효과가 가장 높은 LSBM Na 2% 처리구와 LSBM Solution (LSBM Sol) 2% 처리구 그리고 열처리 LSBM (LSBM Heat) 2%를 이용하여 rumen simulation continuous culture (RSCC) system을 이용한 반추위 내 미생물 발효 특성에 대한 연구가 실시되었다.

시험 I *in vitro* 시험에서 모든 LSBM 처리구에서 전체 배양시간 평균 pH수준, gas 생성량,  $\text{NH}_3\text{-N}$  농도, 건물소화율, VFA 생성량 그리고 ADF 소화율은 배양시간이 지남에 따라 대조구에 비해 낮은 결과를 나타내었다 ( $p < 0.05$ ). 반추위 내 미생물단백질 합성량은 대조구가 LSBM 처리구 보다 통계적으로 높은 결과를 나타내었으며 ( $p < 0.05$ ), LSBM 수준이 증가할수록 반추위 내 미생물 단백질 합성량은 감소하는 경향을 나타내었다. UDP 함량은 대조구보다 LSBM 처리구에서 높은 결과를 나타내었으며 ( $p < 0.05$ ), 특히 LSBM Sol 처리구는 대조구에 비해 각각 2%, 4% 그리고 8% 처리군에서 11.18%, 11.54% 그리고 29.11%의 UDP 함량이 증가하였다.

시험 II는 RSCC system을 이용하여 반추위 내 미생물 발효특성에 대한 시험이 실시되었다. 시험사료는 대조구와 *in vitro* 시험 중 대조구와 UDP 효과가 높은 LSBM Na 2%, LSBM Sol 2% 그리고 LSBM Heat 2% 처리한 사료 4처리 4반복(4×4 Latin square)에 의해 15일간 시험이 실시되었으며, 배양 마지막 3일 동안의 sample을 이용하여 분석을 실시하였다. 전체 배양 기간 중 모든 처리구에서 적응기간 동안 불규칙적인 반추위 미생물 발효 특성을 보였으나 배양 12일 이후 안정된 발효특성을 나타내었다. Sampling 기간 동안의 각 처리간의 평균 pH는 모든 LSBM 처리구에서 대조구보다 높았다( $p < 0.05$ ).  $\text{NH}_3\text{-N}$  함량, VFA 함량 그리고 반추위 내 미생물 단백질 합성량은 LSBM 처리구가 대조구에 비해 낮은 결과를 나타내었다( $p < 0.05$ ). UDP 함량은 대조구, LSBM Heat 2%, LSBM Na 2% 그리고 LSBM Sol 2%에서 각 41.55, 43.49, 45.28 그리고 43.52%로 모든 LSBM 처리구가 대조구에 비해 유의하게 높은 경향을 나타내었다( $p < 0.05$ ).

시험 I과 시험 II에서 UDP 함량은 LSBM 처리구에서 lignosulfonate 처리 수준이 증가할수록 증가하는 경향을 나타내었고, 모든 LSBM 처리구는 대조구에 비해 높은 UDP 함량을 나타내었다. 이와 같은 결과는 사료원으로써 대두박에 대한 lignosulfonate 처리가 coating 작용과 열처리에 의한 물리·화학적 효과로 인하여 대두박의 단백질 분해율을 저해 시킨 것으로 사료된다. 그러나 LSBM 처리군 중 건물소화율과 반추위 내 미생물단백질 합성량은 LSBM 2% 처리구에서 가장 높은 결과를 나타내었다.

따라서, 반추가축 사료내 LSBM 첨가가 *in vitro*와 RSCC system을 이용한 반추위내 미생물발효 특성 시험에서 반추위 내에서 by-pass protein 함량을 증가시키는 결과를 나타내었으며, 추후 착유우를 이용한 LSBM 급여를 시험을 통하여 유단백질 증진효과에 대하여 추가적인 평가가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 인 용 문 헌

- AOAC. 1984. Official Methods Analysis(12th Ed.). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA. Washinton D. C.
- Atwal, A. S., Mahadevan, S. and Wolynetz, M. S. 1995. Increased milk production of cows in early lactation fed chemically treated soybean meal. J. Dairy Sci. 78:598-603.
- Chalupa, W. 1975. Rumen bypass and protection of proteins and amino acids. J. Dairy Sci. 58:1198-1218.
- Chaney, A. L. and Marbach, E. P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clin. Chem. 8:130-132.
- Erwin, E. S., Marco, S. J. and Emery, E. M. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. J. Dairy Sci. 44:1768-1771.
- Ganesh, D. and Grieve, D. G. 1990. Effect of roasting raw soybeans at three temperatures on *in situ* dry matter and nitrogen disappearance in dairy cows. J. Dairy Sci. 73:3222-3230.
- Getachew, G., Pittroff, W., Putnam, D. H., Dandekar, A., Goyal, S. and Depeters, E. J. 2008. The influence of addition of gallic acid tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on *in vitro* rumen fermentation and microbial protein synthesis. Anim. Feed Sci. and Tech. 140:444-461.
- Lee, S. C., Moon, Y. H., Kim, K. J. and Kim, B. K. 1997. The estimation of nutrient degradabilities of lignosulfonate-treated soybean meal in the rumen and intestine of dairy cows. Kor. J. Anim. Nutr. Feed. 21:285-294.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, R. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-276.
- Lynch, G. L., Berger, L. L., Merchen, N. R., Fahey, G. C. Jr. and Baker, E. C. 1987. Effects of ethanol and ethanol and treatments of soybean meal and infusion of sodium chloride into the rumen of ruminal degradation and escape of soluble and total soybean meal protein in steers. J. Anim. Sci. 65:1617-1625.
- Mansfield, H. R. and Stern, M. D. 1994. Effects of soybean hulls and lignisulfonate-treated soybean meal on ruminal fermentation in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 77:1070-1083.
- Mansfield, H. R., Endres, M. I. and Stern, M. D. 1994. Influence of non-fibrous carbohydrate and degradable intake protein on fermentation by ruminal microorganisms in continuous culture. J. Animal Sci. 72:2464-2474.
- McDougall, H. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. Biochemical J. 43:99-109.
- Neves, C. A., Santos, G. T., Matsushita, M., Alves, E. M., Oliveira, R. L., Branco, A. F., Silva, D. C., Furlan, A. C. and Petit, H. V. 2007. Intake, whole tract digestibility, milk production, and milk composition of Holstein cows fed extruded soybeans treated with or without lignosulfonate. Anim. Feed Sci. and Tech. 134: 32-44.
- Nowak, W., Michalak, S. and Wylegala, S. 2005. *In situ* evaluation of ruminal degradability and intestinal digestibility of extruded soybeans. Czech. J. Anim. Sci. 50(6):281-287.
- Reynal, S. M. and Broderick. 2005. Effect of Dietary Level of Rumen-Degraded Protein on Production and Nitrogen Metabolism in Lactating Dairy Cows. J. Dairy Sci. 88:4045-4064.
- Subuh, A. M. H., Rowan, T. G. and Lawrence, T. L. J. 1996. Effect of heat or formaldehyde treatment on the rumen degradability and intestinal tract apparent digestibility of protein in soya-bean meal and in rapeseed meals of different glucosinolate content. Anim. Feed Sci. Tech. 57:257-265.
- Statistical Analysis System Institute, Inc. 2009. SAS user's guide: Statistics. Version 9.1 Edition. SAS Institute, Inc., Cary, N.C.
- Stern, M. D. 1984. Effect of lignosulfonate on rumen microbial

- degradation of soybean meal protein in continuous culture. *Can. J. Anim. Sci.* 64:27.
- Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. 1981. Principles and procedures of statistics, 2nd ed. McGraw-Hill, New York.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. D. and Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Veen, W. A. G. 1986. The influence of slowly and rapidly degradable concentrate protein on a number of rumen parameters in dairy cattle. *Neth. J. Agric. Sci.* 34, 199-207.
- Windschitl, P. M. and Stern, M. D. 1988. Evaluation of calcium lignosulfonate-treated soybean meal as a source of rumen protected protein for dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 71: 3310-3322.
- Windschitl, P. M. and Stern, M. D. 1988. Effects of Supplementation of diets Containing Lignosulfonate-treated soybean meal on Bacterial Fermentation in continuous Culture of Ruminal Contents. *J. Anim Sci.* 66:2948-2958.
- (접수일자 : 2010. 7. 21 / 수정일자: 2010. 9. 29 / 채택일자 : 2010. 9. 30)