

STANOVENÍ TĚKAVÝCH LÁTEK V TRAVNÍCH A KUKUŘIČNÝCH SILÁŽÍCH MIKROEXTRAKCÍ NA PEVNÉ FÁZI A PLYNOVOU CHROMATOGRAPHIÍ S HMOTNOSTNĚ-SPEKTROMETRICKOU DETEKČÍ

ŠTĚPÁNKA CHMELOVÁ^a, JAN TRÍSKA^b,
KAMILA RŮŽIČKOVÁ^b a PAVEL
KALAC^c

^a Katedra biologie, Pedagogická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Jeronýmova 10, 371 15 České Budějovice, ^b Ústav systémové biologie a ekologie Akademie věd ČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ^c Katedra aplikované chemie a učitelství chemie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice
chmel@pf.jcu.cz, triska@usbe.cas.cz,
ruzickova@usbe.cas.cz, kalac@zf.jcu.cz

Došlo 30.4.07, přepracováno 11.2.08, přijato 31.3.08.

Klíčová slova: těkavé látky; travní siláže; kukuřičné siláže; SPME head-space, GC-MS

Úvod

Siláže jsou vedle čerstvé píce a sena široce používanými krmivými pro přežvýkavce ve všech vyspělých zemích. Silážování představuje velmi složitý biologický a mikrobiální proces, při kterém jsou za anaerobních podmínek činností bakterií mléčného kvašení přeměňovány rostlinné cukry na konzervující kyseliny mléčnou a octovou a na oxid uhličitý, a to za současného poklesu pH konzervované hmoty.

Jakost siláží se stanovuje kvalitativními ukazateli¹, zejména hodnotou pH, titrační kyselostí vodného výluhu (KVV), obsahem amoniaku a obsahem kyselin vznikajících kvasnými procesy – mléčné, octové, propionové a nežádoucí kyseliny máselné.

V silážích jsou přítomny četné těkavé látky, které vytvářejí typickou vůni kvalitních siláží a také ovlivňují chuť, a tím do určité míry i příjem siláží zvířaty. Některé z nich mohou přecházet do mléka (příp. masa) a ovlivnit tak výslednou kvalitu živočišných produktů^{2–4}. Jde hlavně o nižší alkoholy, těkavé mastné kyseliny a jejich estery, aldehydy, ketony, terpeny a fenolické látky. Část těchto látek může přecházet do siláže přímo z výchozí píce, některé však mohou vznikat až při fermentačním procesu, příp. během dlouhodobého skladování siláže.

Stefanon a Procida³ identifikovali ve vzorcích siláží

a následně sýrů připravených z mléka dojníc krměných těmito silážemi 62 těkavých látek (z toho 12 aldehydů a ketonů, 16 alkoholů, 17 esterů, 2 uhlovodíky a 4 sirmé sloučeniny). Zjistili, že vliv složení těkavých látek v krmivech na zastoupení těkavých látek v sýrech je menší než vliv mikrobiálních a chemických přeměn během procesu zrání sýrů.

Technikou analýzy látek v prostorách nad siláží v uzavřené vialce (tzv. dynamické headspace) a GC-MS analýzy bylo identifikováno 41 těkavých sloučenin, které přešly do mléka ze tří druhů ověřovaných krmiv: lučního sena, sena kombinovaného s kukuřičnou siláží a sena s kukuřičnou a travní siláží².

Stanovení těkavých látek v silážích není v literatuře příliš popisováno. Ojedinelé práce byly publikovány v 80. letech v Japonsku. Travní siláž byla destilována s vodní parou, destilát byl extrahován diethyletherem a extrakt byl analyzován metodou GC-MS. V silážích převládaly 2-fenylethan-1-ol, 4-ethyl-2-methoxyfenol a 4-ethylfenol (cit.⁵). Jiní autoři⁶ extrahovali těkavé látky ze siláží kapalinou, směsí pentanu a diethyletheru (1:1). Extrakt zkoncentrovali na Vigreuxově destilační koloně, přitom se však zřejmě ztratily těkavé látky, protože jako dominantní látku zjistili kyselinu máselnou. Stejný postup extrakce byl použit u kukuřičné siláže, kde převládajícími látkami byly kyseliny octová, máselná a 3-methylbutanová. Z ostatních látek byly nalezeny různé C₅ alkoholy, dále (Z)-hex-3-en-1-ol a 2-fenylethan-1-ol.

Cílem naší práce bylo stanovit dominantní těkavé látky v travní a kukuřičné siláží metodami mikroextrakce na pevné fázi (SPME) a plynové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí (GC-MS) a dále zjistit, jak se mění jejich složení vlivem použití inokulantů (očkovacích či startérových látek) různých mléčných bakterií při silážování píce.

Materiál a metody

Použitá přístroje a chemikálie

Pro stanovení těkavých látek metodou SPME bylo použito poly(dimethylsiloxan)ové vlákno (PDMS) s tloušťkou vrstvy 100 μm s navázanou stacionární fází na základě polydimethylsiloxanu (Sigma-Aldrich, ČR). K analýzám byl použit plynový chromatograf Finnigan GCQ v kombinaci s hmotnostním detektorem typu iontové pasti. Byla použita kapilární kolona Zebron ZB 5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm). Použité standardy (4-ethylfenol, 2-methoxy-4-vinylfenol, α-pinén, β-humulén a α-cyklo-citral) byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich, ČR.

Příprava siláží v laboratorním měřítku a stanovení jejich jakosti

V průběhu roku 2005 byly založeny čtyři modelové laboratorní pokusy přípravy siláží (dvě travní siláže a dvě

Tabulka I

Charakteristika píce použité pro laboratorní přípravu siláží

Číslo pokusu	Datum	Botanické složení, odrůda	Pořadí seče	Zralost	Sušina [g kg ⁻¹]
Tráva I	7.6.05	66 % trávy (psárka luční, kostřava červená, lípnice luční, psineček tenký) ostatní byliny 34 % (svízel bílý, mochna pětilístek, rozrazil rezekvítek)	druhá, nehnojený porost	metání	302
Tráva II	7.6.05	67 % trávy (ovsík vyvýšený, psárka luční, kostřava červená) 33 % ostatní byliny (svízel bílý, rozrazil rezekvítek, řebříček obecný, svízel přítula)	druhá, stejný porost hnojený N, P a K	metání	330
Kukuřice I	26.9.05	Markíza (FAO 280)	-	mléčně-vosková	313
Kukuřice II (jiný porost)	14.10.05	Markíza (FAO 280)	-	mléčná zralost	354

siláže kukuřičné). Travní porosty byly silážovány bez zavádění, jedna z variant byla připravena z píce zavdlé na obsah sušiny přibližně 400 g kg⁻¹. Trávy byly sklizeny po delším suchém období a některé složky porostu již dřevnatěly. Píce rozřezaná na délku 6–8 cm byla udusána do konzervárenských sklenic objemu 720 cm³ s hustotou 450 g dm⁻³ u trav a 520 g dm⁻³ u kukuřice. Sklenice byly uzavřeny víčky Omnia. Tato modelová sila umožňuje unik plynů vznikajících během kvasného procesu. Poté vzniká podtlak, který umožní hermetické uzavření a vytvoření nezbytných anerobních podmínek. Sklenice byly uloženy ve tmě při teplotě 20–21 °C po dobu 120 dnů. Metodika této části práce je podrobně popsána v předchozích publikacích^{7,8}.

Charakteristiku výchozí píce uvádí tabulka I.

Pro modelové pokusy silážování byly použity následující varianty (každá varianta po čtyřech sklenicích, celkem 16 pokusných sil pro jeden pokus):

- pro travní siláže: a) kontrolní (bez přidavku aditiva či konzervantu, tzv. negativní kontrola), b) s mravenčí kyselinou (0,3 hm.%), c) s přidavkem homofermentativní mléčné bakterie *Lactobacillus plantarum*, d) zavdlá píce;
- pro kukuřičné siláže: a) kontrolní (bez přidavku aditiva či konzervantu), b) se směsným preparátem mléčných bakterií Microsil, c) s přidavkem heterofermentativní mléčné bakterie *Lactobacillus buchneri* a d) s inokulantem *L. plantarum*.

Dávky všech mléčných bakterií byly 1·10⁵ jednotek tvořících kolonie (KTJ) na gram píce. Použité inokulanty poskytl firma Medipharm CZ, Hustopeče u Brna.

Stanovení běžných kvalitativních ukazatelů provedla akreditovaná laboratoř Agrola Jindřichův Hradec podle jednotných pracovních postupů ÚKZÚZ Brno¹. Vzorek byl odebrán z každého pokusného sila (sklenice). Průměrné zjištěné hodnoty jsou uvedeny v tabulkách II a III.

Zkoncentrování těkavých látek metodou SPME

Po otevření byl ze střední části každé sklenice odebrán vzorek siláže o hmotnosti 2 g do vialky o objemu 7 ml. Vialka byla naplněna do dvou třetin objemu silážní hmotou a ihned uzavřena víčkem. Pro zkoncentrování těkavých látek v silážích metodou SPME headspace bylo použito PDMS vlákno s držákem pro ruční vzorkování. Doba sorpce činila 20 min při teplotě 22 °C. Po této době byly těkavé látky desorbóvány v nástřikovém bloku plynového chromatografu při teplotě 250 °C. Vlákno bylo každý den před použitím zahříváno hodinu při teplotě 250 °C. Stejným způsobem byly v den zahajování modelových laboratorních pokusů zkoncentrovány i těkavé látky z výchozí píce.

GC-MS analýzy

Počáteční teplota kolony 60 °C, dále teplotní program 15 °C/min. do konečné teploty 275 °C (na této teplotě prodleva 15,25 min), teplota nástřiku 250 °C, nosný plyn helium, lineární rychlost 35 cm s⁻¹. Teplota iontového zdroje 200 °C, teplota spojovací trubice mezi termostatem a iontovým zdrojem 275 °C, skenování molekulových hmotností v rozsahu 50–600 Da.

Identifikace těkavých látek

Identifikace těkavých látek v silážích probíhala srovnáním hmotnostních spekter zjištěných látek se spektry knihovny spekter Xcalibur NIST 98/EPA/NIH. Pro účely naší studie byly uvažovány pouze látky vykazující vysokou pravděpodobnost shody spekter. Vybrané těkavé látky pak byly stanoveny srovnáním s vnějšími standardy – 4-ethylfenolem a 2-methoxy-4-vinylfenolem, α -pinenem, β -humulenem a α -cyklocitralem. Relativní směrodatná odchylka pro stanovení 4-ethylfenolu byla 12,1 %

a 2-methoxy-4-vinylfenolu 13,4 %. Terpeny α -pinen, β -humulen a α -cyklocitral byly sice dokázány srovnáním s vnějším standardem, ale jejich obsah nebyl stanoven.

Výsledky a diskuse

V tabulkách II a III jsou uvedeny běžné kvalitativní údaje připravených a analyzovaných siláží. Všechny hodnoty byly vyrovnané a odpovídají parametrům siláží dobré jakosti. Pouze u obou travních siláží ze zavadlé píce (varianty d) byly vyšší hodnoty titrační kyselosti vodného výluhu.

Popsaným postupem bylo nalezeno celkem 21 těkavých látek. Byly to převážně estery nižších mastných kyselin, terpenové a fenolické látky. Bohatší spektrum látek bylo nalezeno v travních silážích. To lze přičítat druhové rozmanitosti travních porostů, ze kterých byla

siláž připravena. Přehled nalezených látek v obou typech siláží je uveden v tabulkách IV a V.

Metodou SPME s použitím PDMS vlákna byly nalezeny některé estery těkavých mastných kyselin a nižších alkoholů (tabulky IV, V). Těkavé mastné kyseliny a alkoholy vznikají v silážích během fermentačních pochodů.

Byla nalezena řada látek terpenové povahy. Terpeny jsou významné vonné látky, v rostlinách poměrně hojné. Dá se proto předpokládat, že do siláží je vnášejí již silážovaná píce. Epi-bicyklohexylidien je odvozen od monocyklického seskviterpenu seskvifelandrenu. Další nalezenou látkou této skupiny byl α -cyklocitral, odvozený od citralu. Citral je nenasycený terpenový aldehyd vznikající oxidací geraniolu. Citral je vonnou složkou mnoha směsných silic. Výskyt α -cyklocitralu v silážích byl ověřen srovnáním s vnějším standardem a potvrzen pouze u kukuřičných siláží. U travních siláží nebyla nalezena shoda spekter. Seskviterpen kadina-3,9-dien byl nalezen metodou

Tabulka II

Parametry ukazující kvalitu travních siláží. Hodnoty jsou průměrem stanovení ze čtyř pokusných sil

Parametr	Pokus I varianty				Pokus II varianty			
	a	b	c	d	a	b	c	d
pH	4,05	4,00	3,90	4,68	4,05	3,95	3,80	4,35
KVV, mg KOH/100 g	535	672	962	1023	860	698	946	1023
NH ₃ , %	0,03	0,02	0,02	0,03	0,04	0,03	0,03	0,07
Mléčná kyselina, %	1,45	0,77	1,35	1,28	1,30	0,95	1,48	1,49
Octová kyselina, %	0,35	0,23	0,30	0,42	0,20	0,22	0,28	0,45
Propionová kyselina, %	0,01	0,10	0,01	0,35	0,01	0,13	0,01	0,01
Máselná kyselina, %	0,17	0,07	0,05	0,05	0,01	0,20	0,01	0,10

Pozn.: KVV – kyselost vodného výluhu, varianty: a) kontrolní siláž, b) kyselina mravenčí, c) *L. plantarum*, d) siláž ze zavadlé píce

Tabulka III

Parametry ukazující kvalitu kukuřičných siláží. Hodnoty jsou průměrem stanovení ze čtyř pokusných sil

Parametr	Pokus I varianty				Pokus II varianty			
	a	b	c	d	a	b	c	d
pH	3,85	3,90	3,99	3,93	3,92	3,88	3,90	3,90
KVV, mg KOH/100 g	1485	1555	1558	1485	1127	1269	1225	1196
NH ₃ , %	0,03	0,04	0,03	0,03	0,02	0,01	0,02	0,02
Mléčná kyselina, %	1,90	1,93	1,64	1,69	1,30	1,44	1,42	1,39
Octová kyselina, %	0,58	0,63	0,79	0,68	0,45	0,53	0,56	0,53
Propionová kyselina, %	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Máselná kyselina, %	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02

Pozn.: varianty: a) kontrolní siláž, b) Microsil, c) *L. buchneri*, d) *L. plantarum*

Tabulka IV
Těkavé látky v travních silážích

Sloučenina	Výchozí píce		Pokus I				Pokus II			
	I	II	a	b	c	d	a	b	c	d
<i>Estery</i>										
Pentyl-isobutyřát	–	–	+	–	–	–	+	–	–	+
Propyl-kapronát	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
Butyl-kapronát	–	–	+	–	–	–	+	–	+	–
<i>Fenoly</i>										
4-Ethylfenol*	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
2-Methoxy-4-vinylfenol*	+	+	–	+	–	–	+	–	+	+
<i>Terpeny</i>										
α -Cyklocitral	–	–	–	+	+	–	–	+	–	–
Epi-bicyklohexylfelandren	+	–	+	+	+	+	–	–	–	+
β -Humulen*	+	–	–	–	+	+	–	–	–	–
β -Neokloven	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–
γ -Muurolen	–	–	–	+	+	+	–	+	–	–
Kadina-3,9-dien	–	+	+	+	+	+	–	+	+	–
α -Pinen*	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+
3-Thujen	+	–	–	–	+	+	–	–	–	–
Cyklosativen	–	–	–	–	–	+	–	+	–	–
Isoleden	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–

Pozn.: – nedetegovatelné; + nalezené a identifikované srovnáním s knihovnou spekter; * látky identifikované s použitím standardu

SPME jako vonná látka u květů petúnií⁹. α -Pinen patří i mezi složky vůně mléka² a sýrů³. α -Pinen byl identifikován italskými autory² ve vzorcích mléka při krmení skotu lučním senem, kukuřičnou a travní siláží. 3-Thujen (spolu s α -pinenem, β -seskvifelandrenem, α -humulenem a dalšími terpeny) byl nalezen v přirozených travních porostech ve Francii¹⁰. Velmi zajímavý je výskyt safranalu u vzorků kukuřičných siláží. Safranal zde může vznikat z pikrokrocinu jako produktu rozkladu karotenoidu zeaxanthinu, který se vyskytuje v zrnech kukuřice. Silážní hmota v našich pokusech obsahovala rozdrčená zrna kukuřice.

Varianty u travních siláží se liší převážně v zastoupení terpenových látek.

V travní siláži z pokusu I je u všech tří variant, jejichž cílem bylo zlepšit průběh konzervačního procesu, zaznamenán větší výskyt terpenových látek než u varianty kontrolní. Bohatá na terpenové látky byla zejména siláž připravená ze zavádě píce. Lze předpokládat, že tyto látky vznikají, resp. se uvolňují, již během zavádění trav (vůně sena při sušení). U varianty kontrolní se v obou pokusech vyskytují estery, v dalších variantách pokusu I však estery nebyly zjištěny. Tady musíme zůstat na úrovni hypotéz. Je

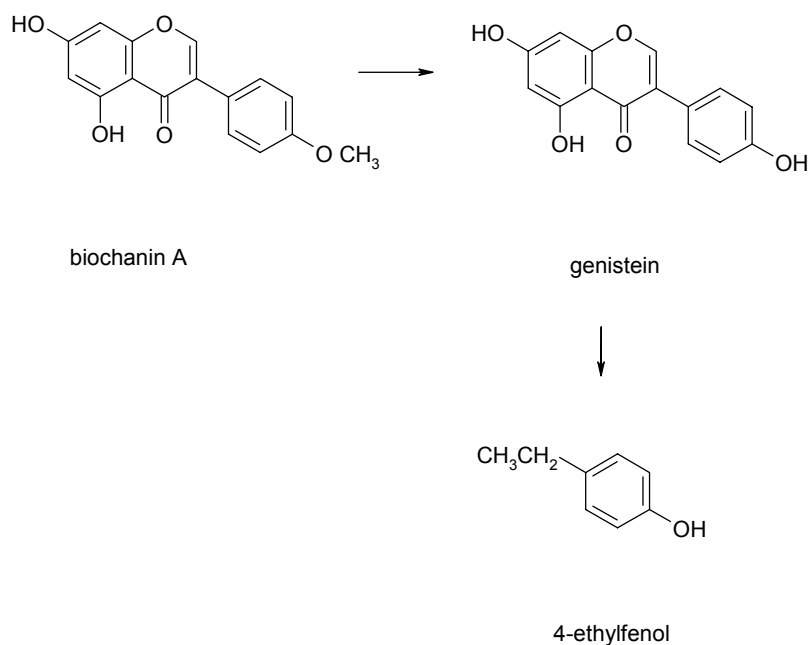
známo, že větší množství nižších alkoholů se vytváří v silážích s horším výsledkem konzervačního procesu¹⁶, což bývají siláže bez přídavku látek potlačujících nežádoucí skupiny bakterií – v těchto pokusech kontrolní varianta. Zajímavý je rovněž čtenější výskyt těkavých sloučenin u siláží připravených z nehnojeného travního porostu. Hnojením se zvyšuje obsah bílkovin i dalších dusíkatých látek na úkor obsahu sacharidů. Nabízí se otázka, zda také neklesá zastoupení těkavých látek, resp. jejich prekurzorů. Literární údaje o této problematice však zatím chybějí.

Z dalších nalezených látek byly ověřeny s použitím standardů 4-ethylfenol a 2-methoxy-4-vinylfenol. Kami a spol.¹¹ identifikovali 4-ethylfenol v kukuřičných silážích v množství 0,22 mg kg⁻¹. V travní siláži našli 4-ethylfenol Kibe aj.⁵ a v siláži kukuřičné Kami aj.¹². K analýzám však použili destilát s vodní parou, k detekci rovněž kombinaci GC-MS. Obě tyto látky pocházejí z píce, ovlivňují převážně vůni siláží. Červenému vínu dávají ethylfenoly a vinylfenoly kouřovou a kořeněnou vůni¹³, silážím pravděpodobně štiplavě květinové až nasládlé aroma. V našich travních silážích byl stanoven 4-ethylfenol v rozmezí 23–33 mg kg⁻¹, s průměrem 30 mg kg⁻¹. V silážích kukuřičných byl zjištěn v rozmezí

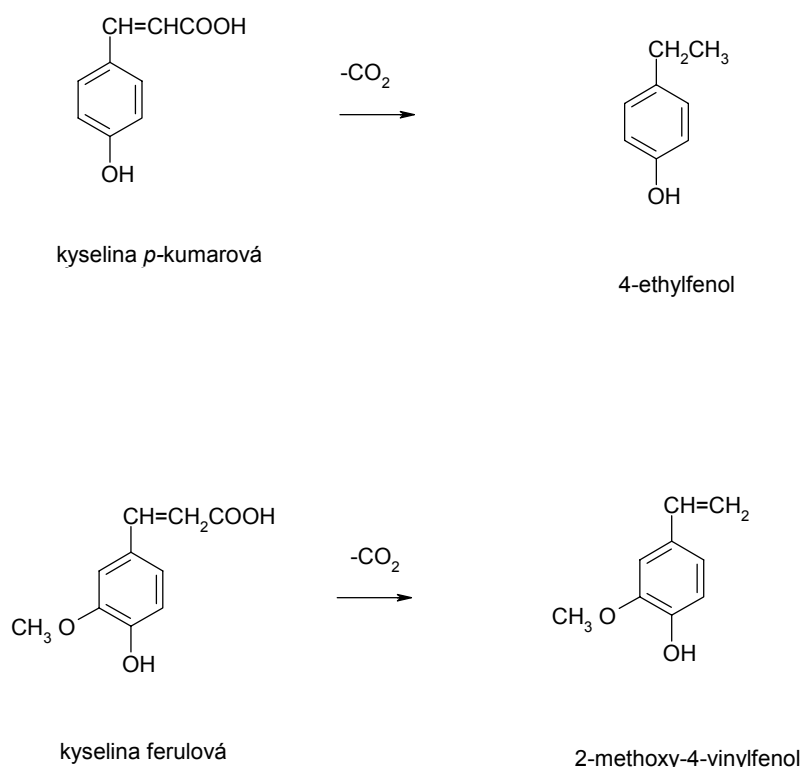
Tabulka V
Těkávé látky v kukuřičných silážích

Sloučenina	Výchozí píce		Pokus I				Pokus II			
	I	II	a	b	c	d	a	b	c	d
<i>Estery</i>										
Propyl-butyrát	–	–	–	–	–	–	+	–	+	+
Propyl-kapronát	–	–	+	–	+	–	–	–	+	+
Butyl-kapronát	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+
Methyl-salicylát	–	–	–	+	+	+	–	–	–	–
<i>Kyseliny</i>										
Skořicová kyselina	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
<i>Fenoly</i>										
4-Ethylfenol*	–	–	+	+	+	+	+	+	–	–
2-Methoxy-4-vinylfenol*	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Terpeny</i>										
α -Cyklocitral*	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+
Longifolen	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
β -Humulen*	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
Safranal	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+

Pozn.: – nedetegovatelné; + nalezené a identifikované srovnáním s knihovnou spekter; * látky identifikované s použitím standardu



Obr. 1. Schéma vzniku 4-ethylfenolu z fytoestrogenů



Obr. 2. Schéma vzniku 4-ethylfenolu a 2-methoxy-4-vinylfenolu v silážích mikrobiální dekarboxylací p-kumarové kyseliny a ferulové kyseliny

33–60 mg kg⁻¹, průměrný obsah činil 50 mg kg⁻¹.

2-Methoxy-4-vinylfenol byl nalezen v kukuřičných silážích v rozmezí 25–168 mg kg⁻¹, průměr činil 85 mg kg⁻¹, zatímco u travních siláží byl jeho průměr vyšší, a to 110 mg kg⁻¹ s rozmezím 95–158 mg kg⁻¹. Obsahy těchto dvou látek byly zjištěny srovnáním s vnějším standardem a vypočítány z osmi vzorků siláží kukuřičných a pěti vzorků siláží travních. Mez detekce pro tyto dvě látky byla 0,1 mg kg⁻¹ a mez stanovitelnosti byla 1 mg kg⁻¹ rovněž pro obě stanovené látky. Koncentrace námi stanovených látek se nachází vysoko nad mezí detekce a mezí stanovitelnosti.

Fenoly vznikající činností mikroorganismů jako sekundární vonné látky při degradaci fenolických kyselin nebo ligninu se vyskytují jako vedlejší produkty probíhajícího mléčného a alkoholového kvašení. Jsou nositeli především netypických chuťových vlastností. 4-Ethylfenol může vznikat v silážích rozkladem isoflavonoidních fytoestrogenů. Schéma tohoto rozkladu je uvedeno na obr. 1. Biochanin A (5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavon) se rozkládá na genistein, ten dále na dihydroxygenistein, z něhož vzniká 4-ethylfenol a další jednoduché produkty¹⁴.

Isoflavonoidní fytoestrogeny se vyskytují jako přirozené složky v řadě rostlin, které jsou součástí travních porostů. Silážováním se estrogení aktivita zvyšuje o desítky až stovky procent. Silně omezený přístup vzduchu zabraňuje odbourávání existujících estrogenů, navíc další

enzymové reakce anaerobních mikroorganismů způsobují, že tyto estrogeny se přeměňují na aktivnější formy nebo se dokonce syntetizují nové. Jako důsledek kvasných procesů probíhají v siláži podobné pochody jako v bacheru přežvýkavců: především vzniká genistein z biochaninu A (cit.¹⁵).

V kukuřičných silážích byl obsah 4-ethylfenolu vyšší než v silážích travních, což je v souladu se staršími japonskými výsledky^{6,11}. Silážní kukuřice se vyznačuje značným obsahem zkvasitelných sacharidů, takže mléčné kvašení probíhá intenzivně. Proto je možné předpokládat, že oba zjištěné fenoly by mohly vznikat ve značné míře činností mléčných bakterií¹⁷, a to dekarboxylací fenolických kyselin ferulové, p-kumarové i dalších, odvozených od kyseliny trans-skořicové. Tímto způsobem by mohl vznikat i 2-methoxy-4-vinylfenol (obr. 2).

V kukuřičných silážích se v obou pokusech při přidavku heterofermentativní mléčné bakterie *L. buchneri* vyskytoval monoterpenový aldehyd safranal. Kyselina skořicová byla zjištěna pouze jednou. Tato kyselina se přirozeně vyskytuje v rostlinách.

Závěr

Tato práce představuje jeden z prvních kroků pro identifikaci těkavých látek v tak významných krmivech, jaký-

mi jsou siláže. Dá se předpokládat, že těchto látek jsou minimálně desítky a řada z nich nepochybně ovlivňuje chuť pro zvířata a podílí se tak na příjmu siláží. Některé z nich přecházejí do mléka a následně i mléčných výrobků, jejichž sensorické vlastnosti mohou zlepšit či zhoršit. Před zemědělským a potravinářským výzkumem leží prostor, jehož poznání je v samých začátcích.

Práce byla umožněna za podpory grantu GA ČR č. 525/05/P544 a výzkumného záměru ÚSBE AV ČR, v.v.i. č. AV0Z60870520.

LITERATURA

- Věstník IV/1.díl. ÚKZÚZ Brno (leden 2005).
- Toso B., Procida G., Stefanon, B.: J. Dairy Res. 69, 569 (2002).
- Stefanon B., Procida, G.: J. Dairy Res. 71, 58 (2004).
- Vasta V., Priolo, A.: Meat Sci. 73, 218 (2006).
- Kibe K., Kasuya, T.: J. Jpn. Grassl. Sci. 25, 251 (1979).
- Kami T., Yoshida S., Ohsaki, K.: Jpn. J. Zootech. Sci. 60, 596 (1988).
- Steidlová Š., Kalač P.: Arch. Anim. Nutr. 57, 359 (2003).
- Steidlová Š., Kalač P.: Arch. Anim. Nutr. 58, 245 (2004).
- Verdonk J. C., Vos R., Verhoeven H. A., Haring M. A., Tunen A. T., Schuurink R.: Phytochemistry 62, 997 (2003).
- Cornu A., Carnat A. P., Martin B., Coulon J. B., Lamaison J. L., Berdagué J. L.: J. Agric. Food Chem. 49, 203 (2001).
- Kami T., Shiga K., Ohsaki K.: Jpn. J. Zootech. Sci. 58, 859 (1987).
- Kami T., Yoshida S., Nishium T., Nakasugi T.: Jpn. J. Zootech. Sci. 61, 1017 (1990).
- Martorell N., Martí M. P., Mestres M., Busto O., Guasch J.: J. Chromatogr., A 975, 349 (2002).
- Velíšek J.: *Chemie potravin*. 2. díl. Osis, Tábor 1999.
- Kalač P., Míka V.: *Přírozené škodlivé látky v rostlinných krmivech*. ÚZPI, Praha 1997.
- Kalač P., Pivničková L.: Živoč. Výr. 32, 641 (1987).
- Couto J. A., Campos F. M., Figueiredo A. R., Hogg T. A.: Am. J. Enol. Vitic. 57, 166 (2006).

Š. Chmelová^a, J. Tříška^b, K. Růžičková^b, and P. Kalač^c (^aDepartment of Biology, Pedagogical Faculty, University of South Bohemia, České Budějovice, ^bInstitute of Systemic Biology and Ecology, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, ^cDepartment of Applied Chemistry, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice): **Determination of Volatile Compounds in Grass and Maize Silages using SPME and GC-MS**

Volatile compounds from grass and maize silages were detected using solid-phase microextraction (SPME), headspace SPME, and GC-MS. Two grass silages were tested untreated, preserved with formic acid and inoculated with *Lactobacillus plantarum*, or with wilted grass up to 400 g kg⁻¹. Two maize silages were tested untreated, inoculated with *L. plantarum* or *L. buchneri* or with a mixture of lactic acid bacteria Microsil. The silages were fermented and stored for 4 months. Volatiles were isolated by headspace SPME. Using this method, 21 volatile compounds, fatty acid esters, terpenes and phenolics were detected. The contents of 4-ethylphenol and 2-methoxy-4-vinylphenol were determined.