



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2018

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap
Hovedveileder: Helge Holo

Vitamin K2 i meieriprodukter

Vitamin K2 in dairy products

Dorota Dynda

Master i industriell matproduksjon
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Forord

Oppgaven ble gjennomført i samarbeid med TINE SA, som en del av erfaringsbasert mastergradsprogram i industriell matproduksjon ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM).

Mastergradsstudiet ble gjennomført i perioden fra 01.01.2016 til 01.02.2018. Oppgaven var en del av et stort forskningsprosjekt og var finansiert av Norges forskningsrådet.

Jeg vil rette en stor takk til TINE FoU ved Ove Johansen, forskningssjef dr. Johanne Brendehaug og professor Helge Holo for motivasjon og inspirasjon til å ta mastergradsstudiet og for mulighet til å gjennomføre det som deltidsstudium. Dette har vært avgjørende for gjennomføringen.

Professor Helge Holo var min veileder og hovedkontaktperson mot NMBU og TINE SA. Jeg vil takke ham for faglig veiledning, gode råd, støtte og motivasjon under arbeidet. Rask tilbakemelding og gode diskusjoner under arbeidet ble satt stor pris på. Jeg vil også benytte mulighet til å takke ansatte ved NMBU for bestilling av kjemikalier, mulighet til å bruke HPLC utstyret på KBM, tilrettelegging under forsøkene og ikke minst et godt og trivelig arbeidsmiljø.

En stor takk rettes til alle mine gode kolleger ved TINE FoU forsker dr. Anne-Grethe Johansen, dr. Camilla Jørgensen, Rolf Heskestad, Cecilie Rask, Elin Simonstad Valle og Inger Ødegård for faglig støtte og gode samtaler under hele perioden.

Til slutt vil jeg takke min kjære mann Kristoffer og barna, Angelica og Oliver, for uvurderlig støtte og tålmodighet.

Ås, Februar 2018

Dorota Dynda

Sammendrag

Hovedmålet med denne oppgaven var å komme fram til en metode for å øke vitamin K2 innholdet i meieriprodukter.

Arbeidet startet med utvikling av en analysemetode for måling av vitamin K2-innholdet i meieriprodukter. Dette var utfordrende fordi det på daværende tidspunkt ikke fantes en offisiell metode for måling av vitamin K2 i meieriprodukter. Det ble tatt utgangspunkt i en publisert metode fra Manoury et al. (2013) og det ble gjort endringer og tilpasninger. Det ble utviklet en High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-metode som omfattet syrehydrolysetrinn etterfulgt av ekstraksjon med heptan. Den nye metoden ga en forenkling av prosedyren for prøveopparbeidelse samt 50% reduksjon i analysetiden ved HPLC sammenlignet med metoden til Manoury et al. (2013). Metoden er i tillegg enklere og raskere sammenlignet med metoder som bruker lipasebehandling (Koivu-Tikkanen, 2001). Metoden er mer effektiv og påviser mer vitamin K2 i produktene enn metoder brukt ved kommersielle, eksterne laboratorier. Metoden ble utviklet for kvantitativ måling av vitamin K2-innholdet i syrnet melk og ble testet på flere ulike fermenterte meieriprodukter og ost.

Det ble gjort en screening av vitamin K2-innholdet i eksisterende TINE-produkter: 20 utvalgte fermenterte produkter og 42 forskjellige ostetyper. Total mengde vitamin K2 og fordelingen av ulike menakinoner: MK-7, MK-8, MK-9, MK-9 4H og MK-10, i meieriprodukter ble målt. I fermenterte meieriprodukter og ost var menakinon MK-9 og MK-8 de dominerende. Kesam og Cottage Cheese skilte seg ut blant fermenterte meieriprodukter ved at disse produktene hadde høyt innhold av vitamin K2. I Kesam ble det i snitt målt 22,2 µg per 100 g produkt vitamin K2 totalt, mens i Cottage Cheese ble det målt 38,6 µg per 100 g produkt. I blåmuggostene, TINE Økologisk Brie, Gamalost, TINE Pultost, Chevre og noen andre oster ble det, i tillegg til MK-9 og MK-8, påvist MK-7. MK-10 ble kun funnet i Gamalost, i tillegg til menakinon MK-9, MK-8 og MK-7. Det høyeste innholdet av vitamin K2 ble målt i Gamalost fra Vik: 123,8 µg per 100 g. Oster tilsatt melkesyre- og propionsyrekultur inneholdt betydelige mengder MK-9 4H, i tillegg til øvrige menakinoner med unntak av MK-7 og MK-10. Jarlsbergost med skorpe inneholdt ca. 110 µg per 100 g og var det produktet som inneholdt mest vitamin K2 totalt blant ostene tilsatt propionsyrekultur.

Effekten av pH på vekst av en kommersiell kultur og produksjon av MK-9 i skummetmelk ble testet i fermenteringsforsøk. Forsøkene viste at høy pH hadde best effekt på både antall

bakterieceller og mengde MK-9 i skummetmelk tilsatt lut. Natriumkarbonat viste seg å ha bedre effekt enn lut ved lav pH. Antall bakterieceller produsert i skummetmelk ved pH 5,0 var høyere når natriumkarbonat ble tilsatt sammenlignet med lut.

Denne oppgaven viser at mange av TINEs produkter er naturlig rike på vitamin K2. Mange av de analyserte produktene tilfredsstiller krav til merking og kan deklarerer med «kilde til» vitamin K2 og noen ostetyper kan deklarerer med «rik på» vitamin K2. Utviklingen av en analysemetode var en viktig milepæl i dette arbeidet. Imidlertid må det mer forskning til for å studere prosessbetingelser og hvordan de påvirker mikroorganismenes produksjon av vitamin K2.

Abstract

The main aim of this study was to develop a method for increasing vitamin K2 content in dairy products.

The work started with the development of an analytical method for measuring vitamin K2 content in dairy products. This was challenging because there was no official method for measuring vitamin K2 in dairy products at that time. The new method was based on modifying the method of Manoury et al. (2013) and modifications and adjustments were made. A High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method was developed, which included acid-hydrolysis followed by extraction with heptane. The new method simplified the procedure for sample preparation and a 50% reduction in HPLC analysis time was achieved compared to the method of Manoury et al. (2013). The new method is faster and easier compared to published methods that use lipase treatment of samples (Koivu-Tikkanen, 2001). The method is more efficient and finds more vitamin K2 in the products than methods used by commercial external laboratories. The method was developed for quantitative measurement of vitamin K2 in fermented milk and was tested on several different fermented dairy products and cheeses. A screening of vitamin K2 contents was made in existing TINE products: 20 selected fermented products and 42 different cheeses. Total amount of vitamin K2 and the distribution of various menaquinones: MK-7, MK-8, MK-9, MK-9 4H and MK-10 in dairy products were measured. In fermented dairy products and cheese, the major form of menaquinone was MK-9 and MK-8. Kesam and Cottage Cheese contained very high concentration of vitamin K2, 22.2 µg per 100 g vitamin K2 and 38.6 µg per 100 g, respectively. In most blue cheeses, TINE Økologisk Brie, Gamalost, Pultost, Norwegian Chevre and some other cheeses, MK-7 was detected in addition to MK-9 and MK-8. MK-10 was only detected in Gamalost, in addition to MK-9, MK-8 and MK-7. The highest content of vitamin K2 was measured in Gamalost from Vik: 123,8 µg per 100 g. Hard cheeses with added propionic acid and lactic acid culture contained MK-9 4H in addition to other menaquinones except from MK-7 and MK-10. Jarlsberg Wheel contained approx. 110 µg per 100 g and was the product that contained most vitamin K2 in cheeses added propionic acid culture.

The effect of pH on growth of a commercial culture and production of MK-9 in skimmed milk was tested in fermentation studies. The experiments showed that high pH had the best effect on the number of bacterial cells and the amount of MK-9 in skim milk with added NaOH. Sodium

carbonate was found to have a good effect at low pH. The number of bacterial cells produced in skim milk at pH 5,0 was higher when sodium carbonate was added than NaOH.

This study shows that many of TINE products are naturally rich in vitamin K2. Many of the analyzed products contained significant amounts of vitamin K2 and can be labeled as "source of" vitamin K2 and some cheese types can be declared "rich in" vitamin K2. Development of an analytical method was an important goal in this work. More research is required to study different process conditions and their influence on microbial production of vitamin K2.

Innholdsfortegnelse

1	Innledning	8
2	Teori	10
2.1	Vitamin K – kjemisk form, kilder, absorpsjon i kroppen	10
2.1.1	Anbefalt daglig inntak	13
2.1.2	Biologisk funksjon til vitamin K	14
2.1.3	Vitamin K og helseeffekter	17
2.2	Bakteriell syntese av kinoner – funksjon i bakteriecelle	20
2.2.1	Bakterier i tarmen	23
2.2.2	Bakterier i mat	23
3	Materialer og metoder	25
3.1	Ekstraksjon av vitamin K2	25
3.1.1	Materialer og kjemikalier	25
3.1.2	Prøveuttak	26
3.1.3	HPLC og deteksjon	26
3.1.4	Kvantifiseringsmetoder	28
3.1.5	Modifisert metode for ekstraksjon av vitamin K2	29
3.1.6	Modifisert HPLC-oppsett	29
3.2	Dyrking i fermentor	30
3.2.1	Medier	31
4	Resultater	32
4.1	Metode-utvikling	32
4.2	Test av ulike kolonner og valg av mobilfase	39
4.3	Kvantifisering av vitamin K	41
4.3.1	UV – bestemmelse av konsentrasjon i standardprøvene	41
4.3.2	Responsfaktor i fluorescensdetektor	42
4.3.3	Internstandard metode og standard tilsetning med og uten internstandard.	44
4.4	Kartlegging av vitamin K2-innhold i TINEs produkter	47
4.4.1	Fermenterte melkeprodukter	47
4.4.2	Ost	49
4.5	Dyrking i fermentor	55
5	Diskusjon	56
5.1	Om metoden	56
5.2	Om resultater fra kartlegging	58
5.3	Om resultater fra fermentering	64

6	Konklusjon.....	65
7	Veien videre.....	66
8	Referanser.....	67

1 Innledning

Vitaminer er organiske stoffer som i små mengder er nødvendige for at kroppen skal fungere normalt. Kroppen vår kan ikke lage vitaminer selv, med unntak av vitamin D, derfor må de tilføres via kosten. Selv om bakterier syntetiserer vitamin K i tarmene er det nødvendig med ekstra tilførsel via kosten, for å få optimal funksjon av vitaminet. For lite vitamin K i kosten fører til mangelsykdommer som kan vise seg i form av manglende koagulering av blod (Dam, 1946).

Vitamin K forekommer i to aktive former, vitamin K1 (fyllokinon) og vitamin K2 (menakinon). Vitamin K1, fra tidligere kjent som vitamin K, er viktig for optimal blodkoagulasjon (Dam, 1946). Funksjonen til vitamin K (både K1 og K2) er å modifisere vitamin K-avhengige koagulasjonsfaktorer til komponenter som er viktige for blodlevring. Den biologiske effekten er knyttet til karboksylering av vitamin K-avhengige proteiner til proteiner med spesiell evne til å binde kalsium (Dam, 1946, Shiraki et al., 2015).

Nyere forskning fokuserer i høyere grad på vitamin K2 og dens undergrupper. Omsetning av vitamin K2 i kroppen skjer mye langsommere enn omsetning av vitamin K1 og dette spiller en viktig rolle for ulike prosesser i kroppen (Schurgers et al., 2007, Tsugawa et al., 2006). Forskningsresultater viser at vitamin K-avhengige proteiner ikke bare spiller en viktig rolle for blodkoagulasjon, men også er involverte i andre prosesser som beinvevets fysiologi og vaskulær forkalkning (Schwalfenberg, 2017, Vermeer et al., 2004). I tillegg er vitamin K2 kjent for å ha en positiv effekt på en rekke andre sykdommer som kreft, diabetes, antikoagulasjonsbehandling med warfarin og enkelte typer av inflammatoriske sykdommer osv. (Beulens et al., 2010, Homma et al., 2006, Shiraki et al., 2015). Det er behov for mer forskning på vitamin K2 og dets nytteverdi i behandlingen av ulike sykdommer.

Vitamin K1 er plantebasert og vitamin K2 er syntetisert av bakterier blant annet i mat og i tarmen. Selv om mange ulike bakterier syntetiserer menakinoner i tarmen, er biotilgjengelighet og det totale bidraget fra vitamin K-inntak lite kjent. Melkesyrebakterier som brukes som starterkultur i fermentering av meieriprodukter syntetiserer menakinoner og meieriprodukter er en viktig kilde til vitamin K2 fra kosten.

Vitamin K har vært mye i fokus i de siste 20 årene, spesielt vitamin K2. De første målingene på vitamin K i kylling var basert på kylling bioassays (Matschiner and Doisy, 1966), men testene var mer kvalitative enn kvantitative. Etterhvert har utviklingen av pålitelige

kromatografiske metoder ført til større nøyaktighet i vitamin K målinger i matvarer (Koivu-Tikkanen, 2000). Koivu-Tikkanen (2000) har vist at matvarer inneholder vitamin K2 i ulike former, som for eksempel menakinon: MK-4, MK-5, MK-6, MK-7, MK-8, MK-9 og MK-10. Det er behov for mer kunnskap om og mer pålitelige kvantifiseringsmetoder for menakinoninnholdet i næringsmidler.

Vitamin K-innholdet, K1 eller K2, er foreløpig ikke inkludert i Matvaretabellen (Matportalen, 2015). Det er relativt lite kunnskap om mengde vitamin K2 i næringsmidler og i hvilken grad kostholdet bidrar til vitamin K-inntak. Vitamin K (K1 og K2) er oppgitt i enkelte utenlandske matvaretabeller. Svensk matvaretabell presenterer flest analysedata for vitamin K1 og begrenset mengde data for vitamin K2. Dansk matvaretabell har ikke egne data, men bruker verdier for vitamin K1 fra den svenske matvaretabellen. Amerikansk tabell oppgir kun verdiene for vitamin K1.

Denne oppgaven fokuserer på utviklingen av en kvantitativ analysemetode for vitamin K2 og hvordan produksjonsprosesser kan påvirkes for at mikroorganismer skal produsere mer vitamin K2. Det er gjort en kartlegging av vitamin K2-innholdet i stort antall TINE produkter.

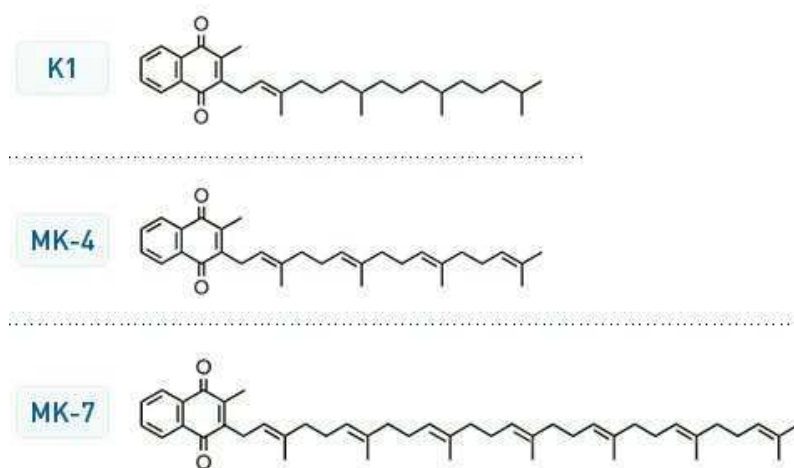
2 Teori

2.1 Vitamin K – kjemisk form, kilder, absorpsjon i kroppen

Vitamin K ble oppdaget av forskeren Henrik Dam og hans medarbeidere ved Biokjemisk Institutt ved Universitetet i København i 1935 (Dam, 1946). Dam har studert kolesterolstoffsifte og sett på viktigheten av kolesterolinnholdet i fôr til kyllinger. Kyllingene utviklet kraftige blødninger ved å spise kolesterolfattig fôr i en til tre uker. Det ble oppdaget at vegetabilsk og animalsk fôr i tillegg til kolesterolet manglet en annen fettløselig forbindelse som var i stand til å koagulere blod. Denne forbindelse kalte Dam for vitamin K (bokstaven K sto for koagulering). I de påfølgende årene ble det gjort flere ulike studier av Dam og hans folk og flere forskergrupper, blant annet Doisy og hans team jobbet med isolering og identifisering av vitamin K. I 1939 ekstraherte Dam, Karres og medarbeidere vitamin K fra grønne blader og beskrev egenskaper og kjemisk formel til vitamin K1. Doisy's forskergruppe oppdaget at vitamin K, isolert fra griselever og laget av bakterier i tarmen, hadde en lignende, men litt annerledes kjemisk struktur. Vitamin K2 ble isolert fra fiskemel av Doisy's gruppe i 1941, og i 1943 ble Dam og Doisy tildelt Nobelprisen i medisin for oppdagelsen og kartleggingen av den kjemiske strukturen til vitamin K.

Den kjemiske strukturen til vitamin K, er beskrevet av Dam og Doisy. Vitamin K er en gruppe kjemiske forbindelser som karakteriseres av en menadion-ring (2-metyl-1,4 naftokinon), en metylgruppe i 2. posisjon og ulike sidegrupper i 3. posisjon. Lengde på de ulike sidegruppene bestemmer form og funksjon til de ulike vitamin K-forbindelsene. Det finnes to naturlige former av vitaminet, K1 (fyllokinon) og K2 (menakinon). I tillegg finnes en syntetisk variant, vitamin K3 (menadion). Figur 1 viser kjemisk struktur til ulike former av vitamin K, med unntak av vitamin K3. Fyllokinon (K1) inneholder en 20-karbonfytylgruppe (4 prenyl-enheter, hver med 5 karbonatomer, hvor den første enheten er umettet) bundet til molekylet. Menakinon (MK, vitamin K2) har en umettet isoprenylsidekjede med varierende antall isoprenylgrupper knyttet til molekylet. Disse benevnes MK-n, hvor n- indikerer antall sidegrupper og er bakgrunnen til inndeling av menakinonene i MK-4, MK-5, MK-6, MK-7, MK-8, MK-9, MK-10 osv. Frem til nå er det to former av vitamin K2, MK-4 og MK-7, som er mest undersøkt og som det finnes flest publikasjoner på.

Vitamin K3 (menadion) har ingen sidegruppe, $n = 0$. Menadion er syntetisk og har ingen effekt på karboksylering, men kan alkyleres til menakinon i animalsk vev og dermed bli biologisk aktiv (Drevon et al., 2004).



Figur 1: Ulike derivater av vitamin K. n = antall isoprenylenheter i sidekjeden. I menakinonene er det dobbeltbindinger i sidekjeden (Wikipedia, 2017).

Den viktigste kilden til vitamin K er kosten. Fyllokinon – vitamin K1 finnes hovedsakelig i mørkegrønne bladgrønnsaker, men også frukt, bær og soyabønner kan inneholde små mengder av vitamin K1 (Dam, 1946, Hey and Brasen, 2015). Andre litteraturkilder viser at små mengder av vitamin K1 finnes i tillegg i margarin, kjøtt, fisk og Natto (Drevon et al., 2004). Fermenterte melkeprodukter og ost, samt gjærede soyabønner, Natto, er gode kilder til menakinoner. Norske forskere fra matforskningsinstituttet Nofima har studert hvorvidt innholdet av vitamin K2 varierer mellom raser (Jersey og Norsk Rødt Fe) og muskler hos storfe (Rødbotten et al., 2014).

Fyllokinon fra kostholdet er en kilde til MK-4 i brystmelk hos mennesker (Thijssen et al., 2002). Vitamin K1 kan omdannes til vitamin K2 (MK4 og menakinoner med korte isoprenyl sidekjer) i kroppen, mest i arterievegger og bukspyttkjertel (Askim, 2001, Nakagawa et al., 2010).

MK4 er et atypisk menakinon i og med at den ikke syntetiseres av bakterier og i enkelte vev (fugl, pattedyr, mennesker) kan dannes fra menadion (MK-0). I rotteforsøk ble det påvist at hjernen, spyttkjertelen og bukspyttkjertelen har en selektiv evne å oppkonsentrere MK-4 til nivåer som er flere ganger høyere enn nivået av fyllokinon og at fyllokinon fra kosten er en

mulig forløper for MK-4 (Shearer, 1995, Shearer and Newman, 2008). Nyere forskning viser at mennesker har et enzym som omdanner vitamin K1 til MK-4 (Nakagawa et al., 2010) enten ved direkte spalting av sidekjede fra fyllokinon i tarmen eller konvertering fra menadion etterfulgt med syntese av MK-4.

Effektiviteten av absorpsjon er avhengig av vitaminets struktur og fettmengde i kosten. Vitamin K1 i brokkoli absorberes bedre om det er løst i olje enn rett fra brokkoli (Drevon et al., 2004). Lengden på isoprenylsidekjeden bestemmer måten vitamin K transporteres i kroppen, hvordan den tas opp i vev og hvordan den skilles ut. Absorpsjonen følger reaksjonsveien for lipider og skjer hovedsakelig i tarmen. (Hey and Brasen, 2015, Shearer et al., 1996). Absorpsjon er avhengig av galle og 40-70% av vitamin K absorberes fra tynntarmen, som inneholder betydelige konsentrasjoner av menakinoner og gallesalter. Svært lite absorberes fra tykktarmen (Shearer, 1995). Leveren er antatt å være det største lagringsstedet for vitamin K, og hovedstedet for syntesen av de vitamin K-avhengige koagulasjonsfaktorene (Shearer, 1995). Metabolitter av vitamin K skilles ut fra kroppen via gallen, tarmen og/eller i urin.

I motsetning til andre fettløselige vitaminer blir vitamin K, spesielt vitamin K1, raskt brutt ned i kroppen, noe som resulterer i relativt lave vevslager. Omsetning skjer raskt og reservoar er raskt tømt når kostinntaket av vitamin K1 er begrenset. Vitamin K-lager er beregnet til 1 -10 µg/kg kroppsvekt for gjennomsnittsperson eller ca. 100 µg, hvilket omtrent tilsvarer det anbefalte daglige inntaket av vitamin K (Drevon et al., 2004).

Omsetning av langkjedede menakoniner i leveren skjer langsommere enn for fyllokinon (Shearer, 1995). Dette gjør at det tas mye bedre opp enn fyllokinon. Halveringstid for fyllokinon er kun 1 – 1,5 døgn (Olson et al., 2002).

Vitamin K, fra planter i form av fyllokinon eller menakinon fra bakterier, er bundet til cellemembran slik at biotilgjengelighet er generelt lav (Shearer and Newman, 2014). Absorpsjon av kortkjedet vitamin K1 og langkjedet vitamin K2 (MK-7 fra Natto) ble testet i en studie til Schurgers et al. (2007) blant kvinner og menn i alderen mellom 25 og 35 år. Absorpsjon ble målt rett etter inntaket av vitamin K i et enkeltdoseforsøk og i en periode på 2 uker. Konsentrasjon av vitamin K i blod og forholdet mellom karboksylert og underkarboksylert osteokalsin ble målt. Serum vitamin K ble brukt som markør for absorpsjon mens karboksylert osteokalsin ble brukt som markør for aktivitet. Studiet viste at både K1 og MK-7 ble absorbert godt 4 timer etter inntaket, men MK-7 hadde betydelig lengre halveringstid og menakinone ble oppkonsentrert til høyere nivåer (7 til 8 ganger) under langvarig inntak

sammenlignet med vitamin K1. I tillegg førte inntaket av MK-7 til mer stabile serumnivåer og mer komplett karboksylering av osteokalsin. Studiet viste at langkjedede menakinoner har en annen omsetningsmekanisme enn fyllokinon som gjør at menakinoner er lengre tilgjengelige for opptak i vev enn fyllokinon.

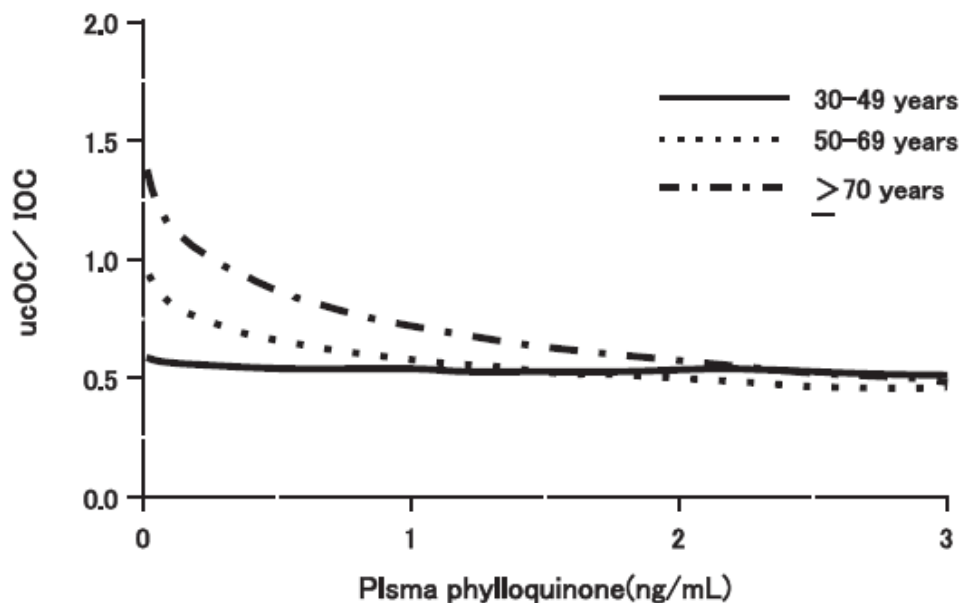
2.1.1 Anbefalt daglig inntak

Anbefalt daglig inntak av vitamin K er bestemt ut i fra mengde vitamin K som kreves for å opprettholde normal blodkoagulasjon. De nordiske anbefalingene er 75 µg av vitamin K per dag for voksne (Lovdata, 2014). I følge Recommended Dietary Allowances (RDA) er det daglige kravet til vitamin K 1 µg/kg kroppsvekt (Morishita et al., 1999, RDAs, 1989). De amerikanske anbefalingene er 120 µg/dag for menn og 90 µg/dag for kvinner over 19 år (Micronutrients, 2001).

Anbefalingene basert på vitamin K-inntaket fra mat er nok for normal blodlevring, men ikke nok til å danne tilstrekkelig mengde karboksylert osteokalsin hos eldre og trolig for lite for å få ønsket effekt mot beinskjørhet og hjerte- og karsykdommer (Askim, 2001). Effekten av mengde vitamin K1-tilskudd på karboksylering av osteokalsin ble testet i et studie til Binkley et al. (2002). Friske voksne menn og kvinner i alderen 19-36 år, deltok i doseundersøkelsen der mengde osteokalsin og underkarboksylert osteokalsin ble målt. Resultater viste at et inntak på 1000 µg vitamin K1 per dag kreves for å oppnå maksimal effekt av vitamin K1 på karboksylert osteokalsin. (Binkley et al., 2002).

Kosthold med lite vitamin K fører til mangelsymptomer og betydelige konsentrasjoner med underkarboksylerte «Gla-proteiner» (vitamin K-avhengige proteiner) sirkulerende i blodet. Mengde underkarboksylert osteokalsin og underkarboksylert Matriks-Gla protein (MGP) i blodet brukes som markører for vitamin K status i bein og blodkar, henholdsvis (Theuwissen et al., 2014).

Behov for vitamin K øker med alderen (Shiraki et al., 2015, Tsugawa et al., 2006). I en studie med sunne japanske kvinner i ulik alder ble vitamin K1-nivå i serum målt og forholdet mellom underkarboksylert osteokalsin og osteokalsin (ucOC/IOC) ble undersøkt. Resultatene viste at forholdet mellom underkarboksylert osteokalsin (markør for beinnedbrytning) og osteokalsin øker med alderen som igjen indikerer høyere risiko for lårhalsbrudd hos eldre.



Figur 2: Aldersavhengig forskjell i forholdet mellom konsentrasjon av plasma fyllokinon og forholdet mellom ucOC/IOC i serum. ucOC – underkarboksylert osteokalsin, IOC - osteocalcin (Shiraki et al., 2015, Tsugawa et al., 2006).

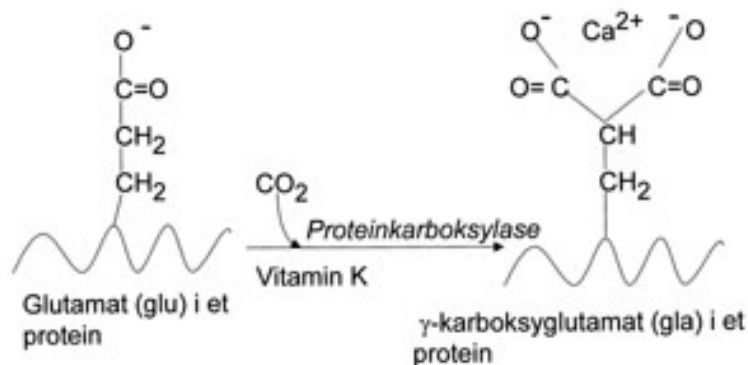
Figur 2 viser en betydelig økning i forholdet mellom underkarboksylert osteokalsin og osteokalsin på et gitt nivå av plasma vitamin K1 observert med økende alder. Større behov for vitamin K med alderen skyldes forringet effekt av γ -karboksylering ved økende alder og påvirker forholdet mellom underkarboksylert osteokalsin og osteokalsin under beinomsetning eller beindannelse.

2.1.2 Biologisk funksjon til vitamin K

Vitamin K er en fettløselig faktor og tilstrekkelig mengde er nødvendig for normalfungerende koagulasjonssystem (Dam, 1946). Vitamin K er viktig for syntesen av koagulasjonsfaktorene II (protrombin), VII, IX og X, og også protein C, S og Z (Dam, 1946, Drevon et al., 2004). Mangel på vitamin K kan føre til alvorlige blødninger. Hos voksne er mangel på vitamin K et ukjent problem, derimot er mangel på vitamin K hos nyfødte godt beskrevet i litteraturen (Dam, 1946, Drevon et al., 2004, Shearer, 1995, Van Winckel et al., 2009). Nivået av vitamin K hos nyfødte er lavt på grunn av at vitamin K i liten grad overføres gjennom placenta til fosteret. For å opprettholde normal koagulering, er det vanlig praksis å gi alle nyfødte intramuskulær injeksjon med vitamin K innen to timer etter fødselen (Helsedirektoratet, 2014). Brystmelk

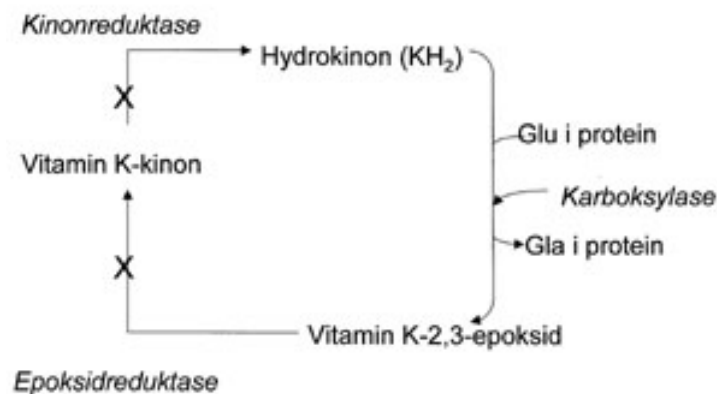
inneholder også lite av vitaminet. (Greer, 2001). Studier viser at plasma vitamin K hos spedbarn og konsentrasjon av vitamin K i morsmelk øker med økt inntak av vitamin K hos mor under graviditet og amming (Greer, 2001).

Vitamin K er viktig som et koenzym og nødvendig for γ -karboksylering av spesifikke glutaminsyre-(Glu)-rester i noen vitamin K-avhengige proteiner (Askim, 2001). I denne prosessen er aminosyren glutaminsyre omdannet til γ -karboksyglutaminsyre (Gla) ved hjelp av γ -karboksylase i vitamin K-syklusen (Figur 3). De karboksylerte proteinene kalles for «gla-proteiner». Karboksyleringen av proteiner, vist i Figur 3, er viktig og nødvendig for at vitamin K-avhengige proteiner skal kunne utøve sin biologiske aktivitet. Som følge av denne prosessen har proteinene fått to karboksylsyrer og kan binde seg til negativt ladde molekyler (for eksempel fosfolipider) i overflatemembranen av ulike celler via positivt ladde kalsiumioner.



Figur 3: Karboksylering av aminosyren glutamat (Glu) til aminosyren γ -karboksyglutamat (Gla) på peptider. Vitamin K deltar (Askim, 2001).

Både vitamin K1 og vitamin K2 kan inngå i vitamin K syklusen og bidra til karboksylering av proteiner (Drevon et al., 2004). Vitamin K som inntas fra kosten er i form av kinon og må reduseres med kinonreduktase til hydrokinon for å kunne inngå i karboksylering av proteiner. Hydrokinon oksideres til vitamin K-epoksidet, som igjen reduseres ved hjelp av epoksidreduktase til vitamin K-kinon (Figur 4).



Figur 4: Figuren viser gjenvinning av vitamin K i vitamin K-syklusen. X-viser sted der warfarin trolig hemmer vitamin K-syklusen (Askim, 2001).

Warfarin er klinisk brukt ved antikoagulasjonsbehandling og hemmer aktiviteten av kinonreduktase og epoksidreduktase (Figur 4). Bruk av warfarin medfører manglende γ -karboksylering av vitamin K-avhengige proteiner og utskillelse av underkarboksylerte proteiner med nedsatt biologisk aktivitet og redusert koagulerende aktivitet. I praksis kan dette bety økt blødningstid, redusert beinmineraltetthet og økt risiko for osteoporose (Shiraki et al., 2015).

En rekke Gla-proteiner er kjent og stadig nye oppdages. Oversikt over Gla-proteiner og deres funksjon er vist i Tabell 1 nedenfor.

Tabell 1: Oversikt over Gla-proteiner og deres funksjon (Berkner and Runge, 2004, Ferland, 1998, Shiraki et al., 2015, Worcester et al., 1993).

	Vitamin K- avhengige proteiner	Funksjon
Blodkoagulering	Protrombin	Deltar ved dannelse av fibrinkoagel, har prokoagulerende effekt
	Faktor VII	
	Faktor IX	
	Faktor X	
	Protein C	Antikoagulant
	Protein S	Kofaktor for protein C
Beinmineralisering	Protein Z	
	Osteokalsin	Syntetisert i osteoblaster og odontoblaster, inneholder tre Gla- rester dermed høy affinitet for kalsiumioner, involvert i beinformasjon gjennom stabilisering av beinkrystaller
	Matrix Gla protein	Inhibitor av bløtvevsforkalkning og sentral regulator av denne prosessen, hemmer forkalkning ved å binde kalsium og hindre krystallvekst, funnet i områder med pågående forkalkning i arterier og andre myke vev
	Protein S	Rapportert til å ha andre funksjoner ut over antikoagulasjon, mangel har vært observert ved osteopeni noe som tyder på en rolle ved beinvevets metabolisme utover koagulasjon, påvist i lever, hjerne, vaskulære glatte muskelceller, osteoblaster.
Andre	Gas6	Har en rolle i blodplateaggregering, inflammasjon og immunsystem regulator, påvist i nervesystemet, og uttrykkes i store deler av hjernen, trolig involvert i patogenetisk mekanisme ved utvikling av Alzheimers sykdom.
	Nephrocalcin	Har evne til å redusere vekst og utfellingen av kalsiumkrystaller i urin, kan spille en rolle i håndtering av kalsium, ved mangel på vitamin D kan føre til overskytende tap av kalsium i urin.
	PRGP1 og PRGP2	Proline-rik Gla-protein, fordelt i ulike vev, mest uttrykt i ryggmargen, fysiologisk funksjon lite kjent

2.1.3 Vitamin K og helseeffekter

Vitamin K er nødvendig for blodkoagulering og er kjent for å være delaktig i beinmetabolismen. Etterhvert som man har funnet ut at det finnes vitamin K-avhengige proteiner i beinvev, har interessen for vitamin K økt og flere studier er gjort for å se om det er en sammenheng mellom vitamin K-status og ulike beinrelaterte sykdommer. Mange kliniske studier viser at tilførsel av

vitamin K i form av kosttilskudd, både K1 og K2, kan ha positiv effekt på beinmetabolisme og osteoporose, mens tilførsel av vitamin K spesielt i form av vitamin K2 kan ha en positiv effekt på hjerte- og karsykdommer (Schwalfenberg, 2017, Villa et al., 2016). Ytterligere studier kreves for å bekrefte effekten, men studier indikerer at bruk av vitamin K kan også være nyttig for en rekke andre kroniske sykdommer som for eksempel kreft, diabetes eller i behandling med blodfortynnende midler, som warfarin.

Osteoporose er en tilstand med redusert beinmasse og endret beinstruktur som utgjør et stort helseproblem i hele verden. Osteoporose er karakterisert ved beinmineralitet (BMD) på 2,5 standardavvik (SD) eller mer under gjennomsnittsverdien for friske, unge, voksne kvinner. Osteopeni er en moderat reduksjon av BMD på minst -1 SD og ikke mer enn -2,5 SD under gjennomsnittet. Basert på Verdens helseorganisasjons (WHO) diagnostiske kategorier, er det anslått at 54% av postmenopausale hvite kvinner i USA har osteopeni og 30% har osteoporose (Weber, 2001). Basert på beinmassemålinger i Norge, er det på landsbasis beregnet at 240 000–300 000 har osteoporose. Statistikk fra Folkehelseinstituttet om beinskjørhet og brudd, viser at cirka 9000 voksne nordmenn bryter hofte og 15 000 bryter håndledd årlig, som konsekvens av beinskjørhet (Folkehelseinstituttet, 2016).

En oversiktsartikkel av Weber (2001) med mange ulike studier viser tydelig at vitamin K spiller en viktig rolle i beinmetabolisme ut over den velkjente funksjon i blodkoagulering. Vitamin K ser ut til å forbedre beinkvaliteten, noe som fører til reduksjon i brudd.

Vitamin K stimulerer osteoblastene til beindannelse gjennom γ -karboksylering av underkarboksylert osteokalsin til osteokalsin (Hey and Brasen, 2015, Villa et al., 2016).

En studie av Orimo et al. (1998) viser at kvinner med mange beinbrudd har lavere vitamin K1-status i blodet og at vitamin K-inntak mye høyere enn dagens anbefalinger (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ kroppsvekt) (RDAs, 1989) forbedrer biokjemiske markører for beindannelse samt beintetthet. Resultater fra studiet viste at tilskudd av vitamin K2 (90 mg per dag i to år) kan øke beintetthet, og anbefalt mengde vitamin K2 er forsvarlig i behandling av osteoporose. Beintetthet økte med 2,2% i gruppen som brukte vitamin K-tilskudd, men gikk ned 7,3% i placebogruppen. Utskillelse av kalsium i urin var redusert i vitamin K-gruppen (Orimo et al., 1998).

Vitamin K påvirker kalsiumomsetningen og bidrar til å binde kalsium i beinvevet. Nyere forskning viser klar sammenheng mellom mengde vitamin K1-inntak og styrke i skjelettet hos voksne mennesker (Binkley et al., 2002). Et daglig inntak på ca. 1000 μg vitamin K1 er nødvendig for å oppnå maksimal karboksylering av sirkulerende osteokalsin.

Flere studier har vist at det er et nært samspill mellom vitamin K og vitamin D. Vitamin D regulerer syntese av mange gener der genprodukter/proteiner ved hjelp av vitamin K-karboksylering kan binde kalsium (Drevon et al., 2004, Weber, 2001, Villa et al., 2016). Effekten av vitamin K og vitamin D på beinmineraltetthet ble testet i en studie hvor 92 kvinner med osteoporose i alderen 55 til 81 år ble tilfeldig delt inn i fire grupper. Gruppe 1 fikk tilskudd av vitamin D3 (75 µg/dag), gruppe 2 fikk tilskudd av vitamin K2 (45 mg/dag), gruppe 3 fikk tilskudd av både vitamin K og vitamin D3 og gruppe 4 fikk tilskudd av kalsium (2g/dag). Resultatene viste at behandling over 2 år med både vitamin K2 og vitamin D3 (dette gjelder for gruppe 3) var mer effektiv og førte til større beintetthet sammenlignet med kvinner som fikk kun kalsiumtilskudd (gruppe 4). Behandling med både vitamin K2 og vitamin D3 (gruppe 3) var mer effektiv sammenlignet med kvinner som fikk kun vitamin K2 eller kun vitamin D3 tilskudd (Iwamoto et al., 2000).

Osteokalsin måles som underkarboksylert serum osteokalsin (markør for beinnedbrytning) og bundet serum osteokalsin (markør for beindanning) (Askim, 2001). Måling av graden av karboksylering av osteokalsin antas å være en mer følsom måling for vitamin K-status enn tradisjonelle tester for blodkoagulasjon. Høyt nivå av serum underkarboksylert osteokalsin er en indikator for lav vitamin K-status og en indikator for lårhalsbrudd hos eldre mennesker (Shiraki et al., 2015).

Forkalkning av blodkarvegger reduserer elastisitet av blodårer og er forbundet med økt risiko for hjerte- og karsykdommer. Vitamin K-avhengige proteiner har vist seg å ha en hemmende effekt på vaskulær forkalkning (Geleijnse et al., 2004). I den såkalte Rotterdamstudien effekten av inntak av fyllokinon og menakinon på aorta forkalkning og koronahjertesykdom i befolkningen ble undersøkt. Kostholdsdata for 4807 friske pasienter (uten hjerte-karsykdommer) ble registrert over en periode på 10 år. Risiko for koronahjertesykdom, total dødelighet og aorta åreforkalkning ble undersøkt. Det ble påvist at både åreforkalkning og relativ risiko for dødelighet pga. koronahjertesykdom ble redusert med inntak av menakinon og ikke fyllokinon. Dette tyder på at tilstrekkelig inntak av menakinon kan være viktig i forebygging av hjerte- og karsykdom.

Denne antagelsen ble bekreftet i et annet observasjonsstudium blant 654 postmenopausale kvinner hvor høyt inntak av menakinoner i kosten (MK-4–MK-10), ikke fyllokinon, førte til redusert risiko for koronarforkalkninger (Beulens et al., 2009).

Kalsifisering av åreveggene er assosiert med lavt nivå av det vitamin K-avhengige, karboksylerte MGP. I en studie på rotter ble effekten av ulike vitamin K kosttilskudd (vitamin K1 og vitamin K2) og mengder (10 mg, 23 µg, 33 µg og 45 µg per dag) på vaskulærforkalkning undersøkt (Schurgers et al., 2001). Vevsspesifikt vitamin K-forbruk ble bestemt i warfarin-behandlede rotter. Studien viste at noen vev, inkludert den arterielle karvegg har en høy preferanse for å akkumulere og bruke menakinon framfor fyllokinon. Underkarboksylert MGP var en risiko for vaskulærforkalkning. Lavt inntak var forbundet med ufullstendig karboksylering av MGP. I dyreforsøk er det funnet at inntak på 45 µg per dag av vitamin K2 eller 375 µg per dag av vitamin K1 fører til karboksylering av MGP. Karboksylert MGP binder til seg kalsium ioner fra blodårene og transporterer dem til skjelettet, dermed minsker innholdet av kalsiumioner i blodårene og arteriene bevarer sin elastisitet.

Andre studier viser at pasienter med hjerteinfarkt kan forebygge kardiovaskulære hendelser ved å bruke warfarin (Reikvam et al., 2003). Det er vist at pasienter som bruker warfarin kan være utsatt for vitamin K-mangel på grunn av interaksjon mellom warfarin og varierende inntak av vitamin K i kosten (Drevon et al., 2004).

Observasjonsstudier indikerer at vitamin K2-rik kost kan føre til redusert risiko for kreft. I en koststudie, hvor 24 340 friske personer i alderen 35-65 år, ble fulgt opp gjennom 14 år og inntak av vitamin K gjennom kosten ble registrert, ble det vist at inntaket av vitamin K2, ikke vitamin K1, var assosiert med redusert forekomst av kreft, spesielt lunge- og prostatakreft (Nimptsch et al., 2010). Den positive effekten ble forklart med at vitamin K2 hemmer vekst av kreftceller i leveren og mage-tarm kanalen.

I en annen studie fant japanske forskere at vitamin K2-tilskudd kan minske risiko for utvikling av leverkreft hos pasienter med skrumplever forårsaket av virusinfeksjon (Habu et al., 2004). Forsøket omfattet 40 kvinner med kroniske leversykdommer, hvorav 21 utvalgte fikk 45 mg vitamin K2 daglig. Studiet viste at daglig inntak av vitamin K2 i større doser kan forebygge leverkreft hos høyrisikopasienter sammenlignet med kontrollgruppen.

2.2 Bakteriell syntese av kinoner – funksjon i bakteriecelle

Kinonene deles i to grupper: naftokinoner og benzokinoner (Collins and Jones, 1981). Naftokinoner deles igjen i fyllokinon (vitamin K1), menakinon (vitamin K2), klorobiumkinon og demetylmenakinon. Benzokinoner deles i plastokinoner og ubikinoner.

Kinoner er membranbundne forbindelser og fungerer som elektron- og protonbærere i fotosyntetiske og respiratoriske elektrontransportkjeder. Elektrontransport skjer via cytokromer og kinoner.

Menakinoner syntetiseres av bakterier som finnes i mat, bakterier som finnes i tarm hos mennesker og dyr og mange andre bakterier som finnes i naturen (Shearer and Newman, 2008).

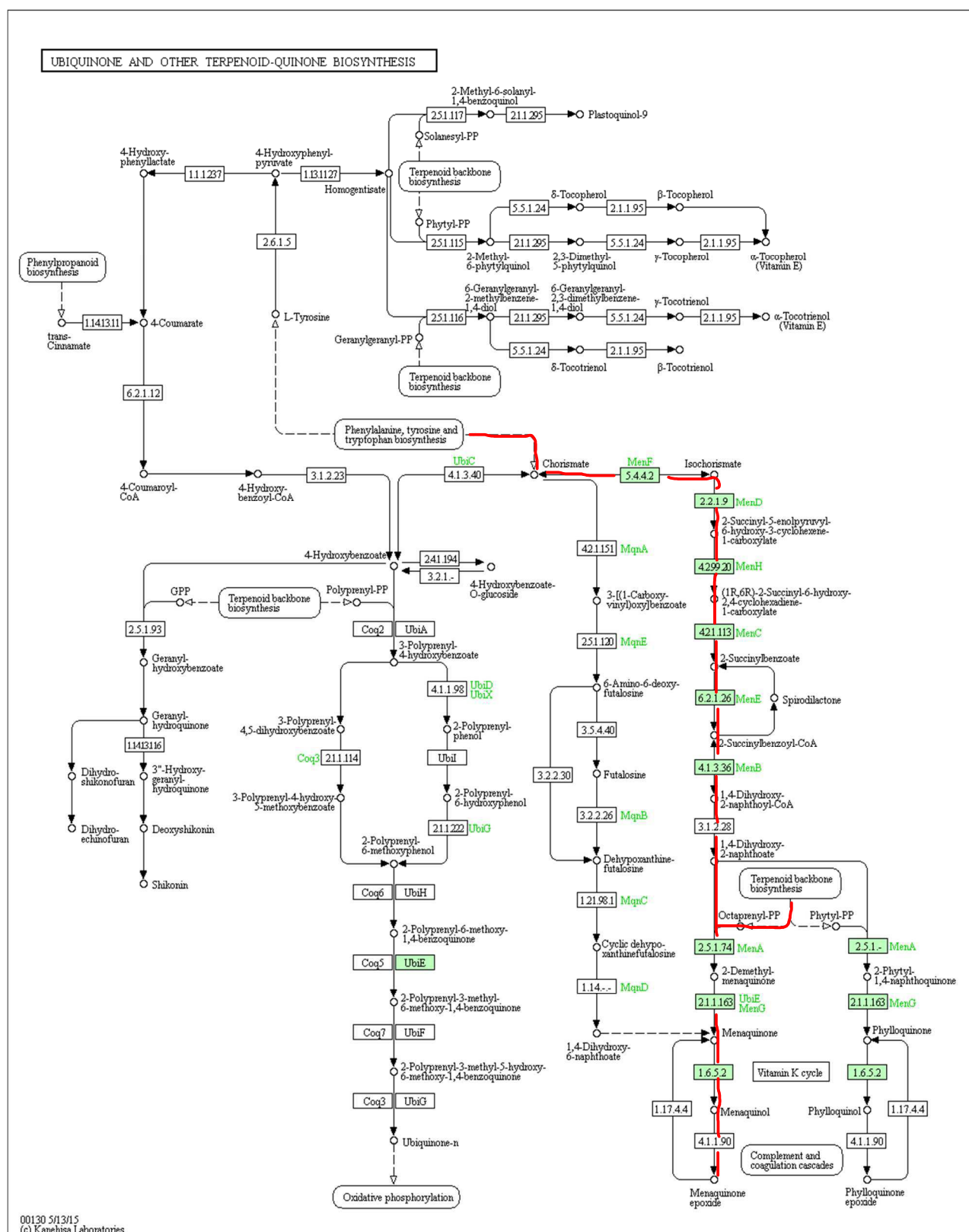
Gram positive bakterier produserer menakinoner. Gram negative bakterier produserer menakinoner, demetylmenakinoner og ubikinoner (Collins and Jones, 1981). Fordelingen mellom de ulike former er avhengig av tilgang på oksygen. For eksempel *Escherichia coli* produserer ubikinoner under aerobe forhold og menakinoner under anaerobe forhold.

I litteraturen er det rapportert menakinoner med 4 til 13 isoprenylenheter. De mest vanlige menakinoner er MK-7, MK-8 og MK-9. MK-7 er hovedmenakinon for gram positive sporedannende bakterier, MK-8 for *E. coli* og MK-9 for *Mycobacterium tuberculosis* (Kurosu and Begari, 2010).

Reaksjonsveien for vitamin K-syntese av bakterien *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* er vist i Figur 5. Isoprenoid sidekjeden syntetiseres separat og tilføres til naftokinonringen for å danne demethylmenaquinon (DMK) og metylering av DMK fullfører menakinon biosyntesen.

Melkesyrebakterier kan ikke syntetisere den jernholdige forbindelse hem, og har derfor ikke elektrontransportkjede. Forskere har vist at noen melkesyrebakterier kan respirere dersom de får tilført hem (Brooijmans et al., 2009). Bruk av hem i vekstmedier og bruk av oksygen hos noen melkesyrebakterier spesielt *Lactococcus lactis* og *Leuconostoc mesenteroides*, fører til fullstendig respirasjon.

Propionsyrebakterier har en spesiell metabolisme og en liten elektrontransportkjede hvor menakinon inngår i produksjon av propionsyre (de Vries et al., 1977).



Figur 5: Reaksjonsveien (merket med rødfarge) for vitamin K syntese hos *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* fra chorismate og oktaprenyl pyrofosfat (PP) (KEGG, 2017). Figuren viser syntesen av MK-8.

2.2.1 Bakterier i tarmen

Menakinoner syntetiseres av bakterieflora i tarmen under anaerobe forhold. Bakteriene lager ulike former vitamin K₂ hovedsakelig menakinoner med lange isoprenylsidekjeder. Menakinon MK-10 og MK-11 er hovedmenakinoner syntetisert av *Bacteroides*, MK-8 er hovedmenakinon syntetisert av *Enterobacteria*, *E. coli*, MK-7 er syntetisert av *Veillonella* species og MK-6 er syntetisert av *Eubacterium lentum*. Andre grupper som *Bacteroides fragilis* og *Arachnia* kan også lage viktige former av vitamin K₂. Den totale mengden menakinon i tarminnholdet utgjør ca. 20 µg/g tørrvekt, hvor MK-10 dominerer (Shearer, 1995, Drevon et al., 2004).

Menakinonene fra tarmen er tett bundet til bakterienes cytoplasmamembran og er sterkt lipofile molekyler. De absorberes bedre i tynttarmen med galle salter enn fra tykktarmen hvor gallesalter mangler (Shearer, 1995). 90% av vitamin K-lageret i leveren utgjøres hovedsakelig av menakinon MK-7–MK-13 i samme mengder som finnes i tarmen. Selv om det er påvist betydelige mengder menakinoner i tarmene, er den mikrobielle produksjonen av menakinoner for liten til å opprettholde syntesen av koagulasjonsfaktor protrombin, dvs. at kosten vil være den viktigste kilden til vitamin K₂.

2.2.2 Bakterier i mat

Bakterier er brukt som starterkultur i fermentering av både mat og drikke, ikke bare som starterkultur i produksjon av meieriprodukter.

Tradisjonell japansk mat, slik som fermentert soya (Natto), er kjent for å inneholde svært høye mengder av menakinon MK-7 (900-1000 µg/100 g), produsert av *Bacillus subtilis* og moderate mengder av MK-8, og vitamin K₁ (Walther et al., 2013).

Melkesyrebakterier brukes som starterkulturer i industriell produksjon av syrnede meieriprodukter og ost. Noen melkesyrebakterier syntetiserer menakinoner i ulik form og med ulik lengde av isoprenylsidekjede (Manoury et al., 2013, Morishita et al., 1999, Walther et al., 2013). Blant melkesyrebakteriene som er kjent for å produsere langkjedede menakinoner er *Leuconostoc* subsp. og *Lactococcus* subsp. (Morishita et al., 1999).

Morishita et al. (1999) har studert melkesyrebakterier og deres evne til å syntetisere ulike former av langkjedede menakinoner: MK-7, MK-8, MK-9 og MK-10, som kan være relevant

for vitamin K kosttilskudd. I studien ble det vist at ikke alle melkesyrebakterier syntetiserer menakinoner, og at *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* og *Leuconostoc lactis* syntetiserer over 230 nmol av menakinon MK-7 til MK-10/g tørkede celler. Menakinoner syntetisert av *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ble identifisert som MK-8 og MK-9 mens menakinoner laget av *Leuconostoc lactis* ble identifisert til MK-9 og MK-10. I studiet ble det konkludert med at mat fermentert med melkesyrebakterier kan være gode kilder til vitamin K. *Lactobacillus* subsp. har vist seg å ikke produsere vitamin K₂ (Morishita et al., 1999), heller ikke *Streptococcus* subsp. Disse slektene anses å være obligat fermentative og de har mistet evne til å produsere K₂ (Walther et al., 2013). Gen-analyse utført av en forskergruppe ved NMBU viser at disse bakteriene ikke har alle gener som koder for vitamin K₂-syntese (Helge Holo personlig meddelelse).

Koivu-Tikkanen (2000) analyserte ulike matvarer av animalsk opprinnelse og viste en oversikt over fordelingen av menakinoner i fisk, kjøtt og ulike oster. I tillegg til MK-7, MK-8, MK-9 og MK-10, ble menakinoner MK-4, MK-5 og MK-6 identifisert og kvantifisert. Menakinon MK-4 produseres ikke av bakterier, men er en metabolitt av fyllokinon og/eller menadion (Walther et al., 2013).

I 2013 gjennomførte Manoury et al. (2013) kvantitativ måling av vitamin K₂ i 62 ulike meieriprodukter fra 5 ulike land. Ved hjelp av HPLC-metoden viste Manoury et al. (2013) at hovedformen i meieriprodukter er menakinon MK-9. Mengde MK-9 og MK-8 var korrelert med hverandre (mengde MK₉ var 4 ganger større enn MK-8), noe som tyder på at mikroorganismer som er i stand produsere MK-9 også produserer MK-8. Denne sammenheng var ikke gjeldende for andre menakinoner som var påvist. Andre former som ble kvantifisert var MK-6, MK-7 og MK-10.

Hojo et al. (2007) i sin studie bestemte konsentrasjon til en annen ny viktig menakinon tetrahydromenaquinon-9 (MK-9 4H). MK-9 4H dannes ved partiell hydrogenering av isoprenoid-kjede i MK-9. MK-9 4H (Figur 6), syntetiseres av propionsyrebakterier i oster, hvor propionsyrekultur er brukt i tillegg til melkesyrebakterier. Hojo et al. (2007) viste at konsentrasjon av MK-9 4H har en sammenheng med antall levende propionsyre-bakterieceller og propionsyrekonsentrasjon (Hojo et al., 2007).

fra *Escherichia coli* (Unden, 1988), dyrket anaerobt, mens MK-9 4H ble ekstrahert fra *Propionibacterium freudenreichii* (Hojo et al., 2007), dyrket starterkultur for Jarlsberg. Begge menakinoner ble ekstrahert med metoden som beskrevet i kapittel 1.1.5.

Det ble laget standardløsninger av MK-4 (2 mg/mL), vitamin K1 (1 mg/mL) og MK-9 (10 µg/mL) i metanol og MK-7 (0,1 mg/mL) i etylacetat. Standardløsninger ble oppbevart i fryseren ved -20°C. Standardløsninger ble temperert i vannbad ved 30°C i 30 minutter før fortynninger ble laget. De aktuelle fortynningene ble laget samme dag som prøvene ble analysert og oppbevart mørkt.

Ultra rent Milli Q vann ble laget med en Merck Millipore Integral 10 system.

3.1.2 Prøveuttak

Det ble analysert 20 ulike fermenterte melkeprodukter med ulik fettprosent (Tabell 16, Tabell 17 og Tabell 18) og 42 forskjellige ostetyper (Tabell 19, Tabell 20, Tabell 21, Tabell 22, Tabell 23 og Tabell 24). Alle produkter ble kjøpt i Oslo-området i perioden juni-oktober 2016. Det ble analysert tre produksjoner med ulik produksjonsdato og to parallelle uttak fra hver produksjon.

For syrnede melkeprodukter ble det tatt ut to parallelle prøver (1 g hver) fra hvert beger/kartong.

Citratvann ble brukt til bearbeiding av osteprøver. Tri-Natriumcitrat dihydrat (20 g) ble løst opp ved oppvarming til 45 - 50°C i deionisert vann (1 L). Citratvann ble autoklavert og pH justert til $7,5 \pm 0,2$. Citratvann ble oppbevart mørkt ved 4°C.

For ost ble det veid ut 5 g prøve som ble tilsatt 5 mL citratvann i 50 mL polypropylen-plast rør og homogenisert med Ultra-turrax (Polytron PT 3000, 21 000 rpm.). Deretter ble det tatt ut to parallelle prøver fra ostemasse (1g hver). Prøvene ble behandlet etter metoden beskrevet i kapittel 1.1.5.

3.1.3 HPLC og deteksjon

HPLC er ansett som en pålitelig analysemetode for vitamin K i næringsmidler (Koivu-Tikkanen, 2001). Fordelene med HPLC-analyse er høy følsomhet og oppløsning, ingen risiko

forbundet med termisk nedbrytning, beskyttelse mot lys under kromatografisk analyse og ulike stasjonær faser og deteksjonssystemer. HPLC ble også brukt som metode til separasjon av ulike former av menakinoner i meieriprodukter av Manoury et al. (2013).

Prinsippet i HPLC-metoden er at stoffene som skal separeres fordeler seg mellom to faser, en fase som er i bevegelse (mobilfasen) og en fase som er i ro (stasjonær fase) (Greibrokk et al., 1998). Prøven injiseres og substansene fordeler seg ulikt mellom mobil- og stasjonærfasen. Stoffene transporteres gjennom en kolonne med forskjellige vandringshastighet på grunn av ulik grad av affinitet. Stoffene separeres og kommer ut ved forskjellige tidspunkter. Type mobilfase, stasjonærfase, lengde og diameter på kolonne har innvirkning på separasjonen. Ved å regulere mobilfasehastighet, mobilfasesammensetning, temperatur eller trykk kan separasjonen optimaliseres. Væskestrømmen føres gjennom en detektor etter kolonnen. Resultatene skrives ut som kromatogrammer. Stoffene identifiseres ved å sammenlikne retensjonstiden (RT) til det ukjente stoffet (tiden det tar for et stoff å bevege seg gjennom kolonnen) med retensjonstiden til standarder. Stoffene kvantifiseres ved arealet av aktuell topp på kromatogrammet.

Deteksjon av vitamin K ble utført med en fluorescens – detektor (FLD) og en ultrafiolett-detektor (UV).

Fluorescensdetektor (FLD) anvendes på stoffer som er naturlig fluoriserende eller på stoffer som lar seg derivatisere til et fluoriserende produkt enten med pre- eller med post-kolonne derivatisering (Greibrokk et al., 1998). Stoffene detekteres ved å måle lyset i form av fotoner som blir forsterket i fotomultikator fra stoffet som blir eksitert. Signalet er proporsjonal med konsentrasjon av det emitterte stoffet i cellen og oppgis i antall counts. En fluorescensdetektor er mer følsom og har høyere selektivitet enn en UV-detektor. Den høye selektiviteten fører til redusert forstyrrelsen fra andre stoffer som løsningsmidler eller forurensninger. Vitamin K må reduseres til hydrokinon-formen for å fluorisere (Manoury et al., 2013).

En UV-detektor brukes til å bestemme sammenheng mellom absorpsjon og målt lys. Beregning av konsentrasjonen til stoffene som måles er basert på Beers lov som sier at absorbansen (A) i en løsning er proporsjonal med løsningens konsentrasjon (c) og med lengden av lysveien (b) gjennom løsningen (Greibrokk et al., 1998).

$$A = \log_{10} P_0/P = \epsilon bc$$

A - absorbansen

P₀ - intensitet på lyset når den går inn i kuvetten

P - intensitet på lyset når den går ut av kuvetten

b - lengden av lysveien

c - konsentrasjon (angis i mol per liter)

ε - molare ekstinksjonskoeffisienten (absorpsjonskoeffisienten)

Absorpsjonskoeffisienten er karakteristisk for det aktuelle kjemiske stoffet som måles. Absorpsjonskoeffisienten, ε = 18900 M⁻¹cm⁻¹ ved 248 nm, er den samme for alle vitamin K variantene (Dunphy and Brodie, 1971).

3.1.4 Kvantifiseringsmetoder

Sammenhengen mellom stoffmengde som passerer gjennom detektoren og detektorens respons danner grunnlaget for beregning av konsentrasjon av stoffet i prøven.

Ekstern standardmetode, internstandard og standard tilsetning ble brukt til kvantifisering av vitamin K.

Med ekstern standardmetode sammenlignes signalet (målt som areal under toppen på kromatogrammet) til stoffet som analyseres direkte med signalet til stoffet i standardprøven. Standardkurve settes opp ved å plote signalet av stoffet i standardene med ulike konsentrasjoner mot mengde stoff i prøven.

Internstandard korrigerer for massetap og fortynningseffekter under prøvebearbeidelsen, korrigerer variasjoner i injisert volum og korrigerer for endringer i de kromatografiske betingelsene. En internstandard tilsettes prøveløsningen i en kjent mengde og tilsettes før prøveopparbeidelsen starter. En god internstandard må være separert fra andre stoffer i prøven og den skal ikke være tilstede i prøven. En internstandard må ha retensjonstid og egenskaper

som er nær stoffet som skal bestemmes. (Greibrokk et al., 1998). Standardkurven settes opp etter analyse av kjente mengder stoff og internstandard. Arealforholdet stoff/internstandard plottes mot innhold av samme stoff i prøven.

Ved standard tilsetning tilsettes ulike kjente mengder av standardprøve til ukjent prøve. Prøvene med og uten tilsetning analyseres og signalene plottes som funksjon av økningen i konsentrasjon til standardprøve. Ved å ekstrapolere kurven til null avleses den opprinnelige konsentrasjonen i prøven som avstand langs x-aksen fra origo til skjæringspunktet.

3.1.5 Modifisert metode for ekstraksjon av vitamin K2

De innledende forsøkene ble utført etter metoden beskrevet av Manoury et al. (2013). Det ble gjort flere modifikasjoner og tilpasninger.

Endelig metode kan oppsummeres slik:

1g syret melk/1g ostemasse (ost:citartvann 1:1) ble veid inn i engangs polypropylen-plast (PP) sentrifugerør (15 mL). Det ble tilsatt 1 mL heptan og blandet på en wirvelmixer IKA Minishaker MS2. Deretter ble det tilsatt 2,05 mL av isopropanol blanding bestående av 0,2 mL 37% saltsyre, 0,2 mL internstandard K1 (2 µg/mL) og 1,65 mL isopropanol. Prøvene ble blandet på whirlmixer IKA Minishaker MS2 og varmet opp i en varmeblokk ved 70°C i 30 min. Prøvene ble avkjølt i et vannbad med kaldtvann før de ble ekstrahert med 2 mL heptan i 30 sekund. Prøvene ble sentrifugert 5 min ved 4000 rpm. Heptanfase ble overført til små rør (polypropylen plast Microvials) og injisert i HPLC. Alle trinn av ekstraksjonen ble utført under redusert lys.

3.1.6 Modifisert HPLC-oppsett

Modifisert HPLC-oppsett i forhold til Manoury et al. (2013).

HPLC brukt til analyse av vitamin K2 (Dionex Ultimate 300, Thermo Scientific), ble utstyrt med en forkolonne (Trident TM Direct In-Line Filter) og en separasjonskolonne (Shiseido Capcell pak C 18 MGII 100A 3 µm, 2,0 x 100 mm kolonne). I tillegg ble det brukt en

postreduksjonskolonne (Shiseido CQ-R 2,0 mm id x 20 mm kolonne) for FLD. Kolonne temperatur ble satt til 50°C, injeksjonsvolum ble satt til 0,2 – 1 µL på FLD og 10 µL på UV, strømningshastighet ble satt til 0,2 mL per minutt.

De ulike vitamin K variabler ble eluert isokratisk, med en løsning bestående av 1:1 isopropanol og metanol.

Konsentrasjon av vitamin K1, MK-4, MK-7, MK-8, MK-9 og MK-9 4H i standardprøvene, ble bestemt med UV-detektor ved 248 nm og mengde menakinoner ble beregnet etter Beers lov med $\epsilon = 18\,900\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Vitamin K1 og de ulike menakinoner ble redusert med reduksjonskolonne og detektert med FLD-detektor, ved en eksitasjonsbølgelengde på 248 nm og en emisjonsbølgelengde på 436 nm.

De ulike form av vitamin K2 (MK-7 – MK-10) ble identifisert ved retensjonstid. Mengde menakinoner i prøvene ble beregnet ved bruk av internstandard vitamin K1, ekstern standard MK-9 og standard tilsetning.

3.2 Dyrking i fermentor

Vitamin K2 produksjon hos en kommersiell kultur ble testet i skummet melk (400 mL, 1% inokulum). Frysetørket *Lactococcus lactis* kultur (100 µL) ble tint og suspendert i M17 buljong (10 mL). Det ble målt OD ved 600 nm (spektrofotometer Shimadzu, UV-1601) og tatt ut prøven til inokulum som tilsvarer 0,4 mL med OD lik 1. Bakteriene ble dyrket ved konstant pH (pH elektrode SE555) og temperatur (25°C) i en fermentor (Titrino 751 GPD) med røring (IKA Eurostardigital, 262 min⁻¹). Effekten av 2N NaOH og 1N Na₂CO₃ (hver for seg) til stabilisering av pH under fermentering ble testet. Det ble tatt ut prøver for bestemmelse av bakterietall og til vitamin K2-analyse. Prøvene til vitamin K2-analyse ble analysert etter metoden beskrevet i kapittel 1.1 5.

Det ble tatt ut prøve av fermentert melk (1mL) for bestemmelse av bakterietall. Prøven ble fortynnet og bakterietall ble bestemt ved innstøpning i M17-agar. Skålene ble inkubert aerobt ved 25°C i 3 dager.

Den mikrobiologiske kvaliteten til melken, brukt til forsøkene, ble undersøkt for totalantall bakterier (Plate Count Agar, PCA) og *Bacillus* subsp. (MYP). PCA skålene ble inkubert ved 30°C i 3 dager, aerobt. Skåler for analyse av *Bacillus* subsp. ble inkubert ved 30 °C i 1 døgn, aerobt.

Før forsøkene ble startet ble pH elektroden plassert i HCl (0,01M) i 20 minutter og deretter skylt med sterilvann (5 mL). En prøve av skyllevannet (1 mL) ble sådd ut for sterilkontroll.

3.2.1 Medier

Vekstmedier og kjemikalier (HCl, NaOH og Na₂CO₃) ble kjøpt hos VWR. Fortynningsvann ble kjøpt hos BioNordica. Det ble brukt deionisert vann rensert med Elga Purelab Option fra BioNordica.

M 17 Broth, 1.15029.0500, Merck

M17 Agar, 1.15108, Merck

Plate Count Agar (PCA), 1.05463.0500, Merck

MYP Agar, 1.05267.0500, Merck

Egg-yolk emulsion, 1.03784.0001, Merck

Bacillus cereus Selective Supplement, 1.09875.0001, Merck

Fortynningsvann:

Dilucup Elegance Maximum Recovery Diluent, 9 mL, BioNordica

4 Resultater

4.1 Metode-utvikling

Det ble tatt utgangspunkt i metoden beskrevet av Manoury et al. (2013) og det ble gjort flere modifikasjoner og tilpasninger.

MK-4 ble testet som internstandard, men på grunn av overlapp av MK-4 toppen i kromatogrammene med topper fra ekstraherte prøver ble den byttet til vitamin K1. I de innledende forsøkene ble det brukt samme mengde og konsentrasjon av internstandard som oppgitt i Manoury et al. (2013).

I forsøkene som er beskrevet nedenfor ble det brukt forskjellige typer syrnet melk og melk med ulik holdbarhetsdato.

Engangs polypropylen-plast (PP) sentrifugerør (50 mL og 15 mL) og glassrør (15 mL) ble testet istedenfor teflonrør, som beskrevet av Manoury et al. (2013).

Utbytte av MK-9 ekstrahert fra Kulturmilk i PP-rør (50 mL) ble sammenlignet med utbytte av MK-9 ekstrahert fra Kulturmilk i PP-rør (15 mL) og i glassrør (15 mL) (Tabell 2). Prøvene ekstrahert i PP-rør 50 mL ble tilsatt vann (10 mL), internstandard, 2N HCl, isopropanol og heksan i samme mengde og konsentrasjon som Manoury et al. (2013). For prøvene ekstrahert i PP-rør 15 mL ble den totale ekstraksjonsvolumet redusert ved å fjerne tilsetning av vann, mengde isopropanol var redusert fra 10 mL til 3,33 mL og mengde heksan var redusert fra 3 mL til 2 mL sammenlignet med metoden til Manoury et al. (2013). Mengde og konsentrasjon av internstandard var samme som i PP-rør 50 mL. Alle prøvene ble varmebehandlet ved 100 °C i 30 minutter før heksan ble tilsatt.

Tabell 2: Mengde MK-9 ekstrahert fra Kulturmelk med heksan ved 100°C i PP-rør 50 mL sammenlignet med mengde MK-9 ekstrahert med heksan i PP-rør 15 mL og glassrør 15 mL (n = 2).

Rør type	Volum (mL)	Beregnet mengde MK-9 (µg/100 g)
PP-rør	50	12,05
PP-rør	15	9,94
Glass-rør	15	12,84

Forsøk med flere ekstraksjoner og fraksjonsutbytte (1 gang ekstraksjon med heksan, 2 ganger ekstraksjon og ekstraksjon fra pellet) ble testet for å se om dette ga større utbytte i forhold til vitamin K2-innholdet i prøven (Tabell 3). Vanlig ekstraksjon dvs. 2 mL heksan-fase, ble sammenlignet med dobbel ekstraksjon dvs. 4 mL heksan-fase og to ganger ekstraksjon fra pellet i prøvene fra Kulturmelk. Prøvene ble varmebehandlet ved 100°C i 30 minutter og det ble brukt samme konsentrasjon av K1 som beskrevet i Manoury et al. (2013).

Tabell 3: Mengde vitamin K2 (MK-8 + MK-9) ekstrahert i PP-rør 50 mL sammenlignet med mengde K2 ekstrahert i PP-rør 15 mL. Mengde K2 etter to ganger (2x) ekstraksjon og 2x ekstraksjon fra pellet sammenlignet med en gang (1x) ekstraksjon (n = 2).

Prøve type	Beregnet mengde K2 etter 1x ekstraksjon, 50 mL PP-rør (µg/100 g)	Beregnet mengde K2 etter 1x ekstraksjon, 15 mL PP-rør (µg/100 g)	Beregnet mengde K2 etter 2x ekstraksjon, 15 mL PP-rør (µg/100 g)	Beregnet mengde K2 etter 2x ekstraksjon og 2x ekstraksjon fra pellet, 15 mL PP-rør (µg/100 g)
Kulturmelk	11,56			
Kulturmelk		10,64		
Kulturmelk 2x			10,92	
Kulturmelk 2x, Pellet				10,43

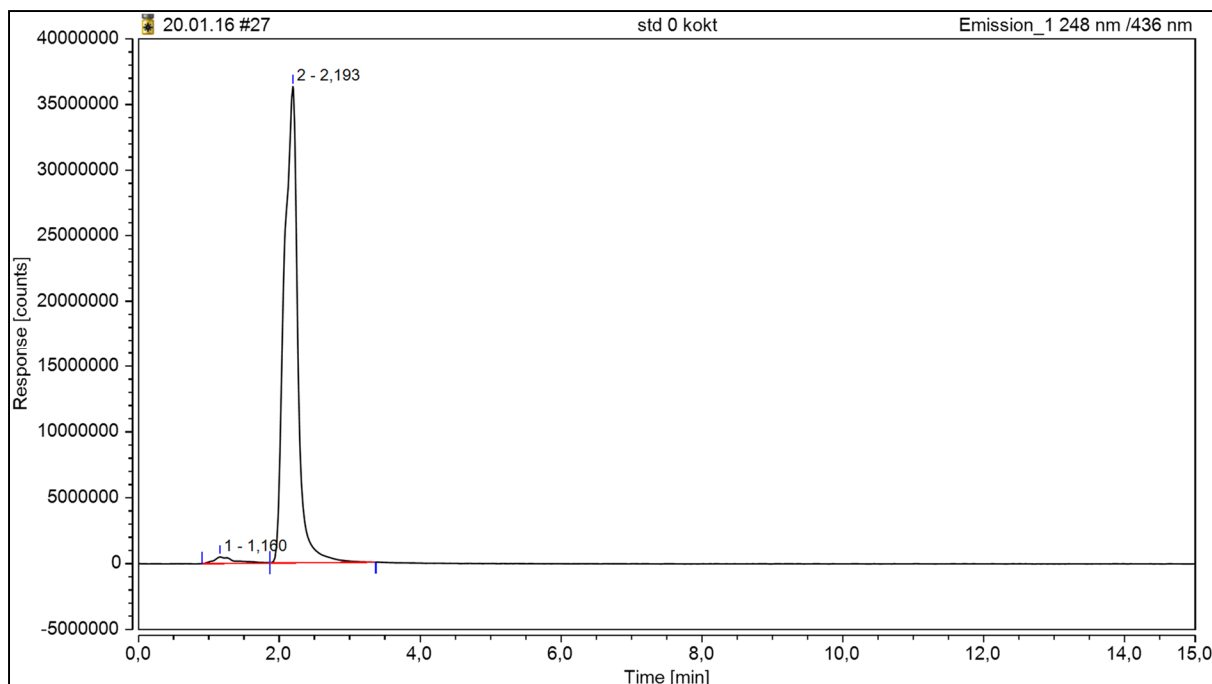
I et annet forsøk ble det testet 3 ganger ekstraksjon med heksan fra syret melk fermentert med en eksperimentell kultur (kommersiell kultur under utvikling) i PP-rør 50 mL, mot 3 ganger ekstraksjon med heksan fra samme melk i PP-rør 15 mL (Tabell 4).

Tabell 4: Mengde MK-9 ekstrahert fra syrnet melk med heksan 3 ganger i PP-rør 50 mL sammenlignet med mengde MK-9 ekstrahert fra samme melk 3 ganger i PP-rør 15 mL (n = 2).

Prøve type	PP-rør	Beregnet mengde MK-9 ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)
Syrnet melk, 3x	50	4,72
Syrnet melk, 3x	15	4,21

Forsøkene har vist at det er ikke store forskjeller i mengde MK-9 ekstrahert med heksan ved 100°C i 30 minutter i PP-rør eller glass-rør (Tabell 2). Størrelsen på PP-rør hadde heller ikke stor effekt på utbytte av ekstrahert MK-9. Forskjellen i mengde MK-9 ekstrahert med heksan ved 100°C i 50 mL PP-rør og 15 mL PP-rør var mindre enn 10% (Tabell 3 og Tabell 4). Resultater fra forsøk med flere ekstraksjoner med heksan ved 100°C og fraksjonsutbytte viser at mindre enn 10% var ekstrahert fra pellet (Tabell 3) og at en gang ekstraksjon er nok til å ekstrahere mest av MK-9 (Tabell 4).

Under metodeutvikling ble det oppdaget en ekstra topp før vitamin K1 på kromatogrammet (Figur 7). Renhet til vitamin K1 ble testet. Kromatogrammet til «ren» vitamin K1 viste ingen topp. Ekstrakter fra vann, uten tilsatt vitamin K1, viste også en ekstra topp i kromatogrammet. Ekstraksjoner fra PP-rør ble testet mot ekstraksjoner i glass-rør for å se om den ekstra toppen skyldtes forurensning fra PP-rør. Resultatene viste at den «ekstra» toppen kom som følge av ekstraksjonsprosedyren (for eksempel fra kjemikalier) og ikke fra den ekstraherte prøven (Kulturmilk eller annet syrnet melk) eller PP-rør. Konsentrasjon til internstandard ble økt, fra 0,5 μg til 2 μg , for å minimere betydningen av ekstra toppen slik at den påvirker bestemmelsen av K1 toppen minimalt. Økt mengde internstandard førte til økt gjenvinning av K1 og økt gjenvinning av MK-9, fra 45% til 56%.



Figur 7: «Ekstra» topp på kromatogrammet fra vannprøve uten tilsatt internstandard ekstrahert med samme metode som syrnet melk.

Effekt av endring av temperatur for varmebehandling av prøver fra 100°C i 30 minutter til 70°C i 30 minutter, ble testet i syrnet melk fermentert med eksperimentell kultur. Prøvene varmebehandlet ved 70°C i 30 minutter i varmeblokk ble tilsatt konsentrert HCl istedenfor 2N som beskrevet i Manoury et al. (2013). Prøvene ble tilsatt isopropanol før varmebehandling og ikke etter som beskrevet i Manoury et al. (2013). Tre ganger ekstraksjon og mengde ekstrahert MK-9 fra prøver varmebehandlet ved 100°C i 15 mL PP-rør ble sammenlignet med tre ganger ekstraksjon og mengde ekstrahert MK-9 fra prøver varmebehandlet ved 70°C i 15 mL PP-rør (Tabell 5).

Tabell 5: Effekt av varmebehandling og mengde MK-9 ekstrahert tre ganger i prøvene varmebehandlet ved 100°C i 30 minutter sammenlignet med mengde MK-9 ekstrahert tre ganger i prøvene varmebehandlet ved 70°C i 30 minutter (n = 2).

Type rør	HCl	Temperatur (°C)	Mengde MK-9 (µg/100 g)
PP-rør, 3x	37%	70	10,13
PP-rør, 3x	2N	100	9,17

I metoden til Manoury et al. (2013) ble det brukt teflonrør (50 mL). Nye teflonrør (13 mL) ble testet mot engangs PP-rør (15 mL). Utbytte av MK-9 ekstrahert med heksan fra syrnet melk fermentert med eksperimentell kultur i nye teflon-rør ved 70°C ble sammenlignet med mengde MK-9 ekstrahert med heksan fra samme syrnet melk i PP-rør ved 70 °C. Prøvemengde ble halvert i forhold til Manoury et al. (2013) og isopropanol ble ytterligere redusert fra 3,33 mL til 1,65 mL. Det ble laget isopropanol blanding bestående av fortynnet internstandard (0,2 mL), konsentrert HCl (0,2 mL) og isopropanol (1,65 mL) som ble tilsatt prøvene (1g) før varmebehandling. Resultater er vist i Tabell 6.

Tabell 6: Mengde MK-9 ekstrahert med heksan i nye teflon-rør ved 70°C sammenlignet med mengde MK-9 ekstrahert i PP-rør ved 70°C (n = 2).

Type rør	Volum (mL)	Temperatur (°C)	Beregnet mengde MK-9 (µg/100 g)
PP-rør	15	70	4,29
Teflon	13	70	4,05

Endring av temperatur fra 100°C til 70°C førte ikke til betydelig endret mengde ekstrahert MK-9. Resultater har vist at tre ganger ekstraksjon av MK-9 med heksan ved 70°C er minst like god eller bedre enn tre ganger ekstraksjon med heksan ved 100°C i PP-rør. Derimot varmebehandling av prøver ved 70°C og isopropanol tilsetning før varmebehandling kan ha gunstig effekt i forhold til utbytte av MK-9 (Tabell 5).

Forsøkene har vist at det ikke er store forskjeller i mengde MK-9 ekstrahert med heksan i teflonrør eller PP-rør ved 70°C i 30 minutter (Tabell 6).

Det ble gjort forsøk med vasket teflonrør og sammenlignet med nye teflonrør. Utbytte av MK-9 ble lavere i vasket teflonrør enn utbytte av MK-9 i nye teflonrør (resultater ikke vist).

Heksan ble brukt som ekstraksjonsmiddel i metoden til Manoury et al. (2013). Heptan er mindre giftig og har høyere kokepunkt enn heksan. Heptan ble derfor undersøkt som ekstraksjonsmiddel under prøveopparbeiding av syrnet melk.

Syrnet melk ekstrahert med heptan i PP-rør ble sammenlignet med ekstraksjon med heptan i teflonrør (Tabell 7). I tillegg ble heptan (1 mL) tilsatt prøvene før isopropanol blanding og

varmebehandling ved 70°C i 30 minutter. Mengde MK-9 og gjenvinning av K1 og MK-9 ble beregnet på bakgrunn av standard tilsetning metoden.

Tabell 7: Mengde MK-9 i syrnet melk fermentert med eksperimentell kultur ekstrahert med heptan ved 70°C i 30 minutter i PP-rør sammenlignet med mengde MK-9 ekstrahert med heptan ved 70°C i 30 minutter i teflonrør (n = 2).

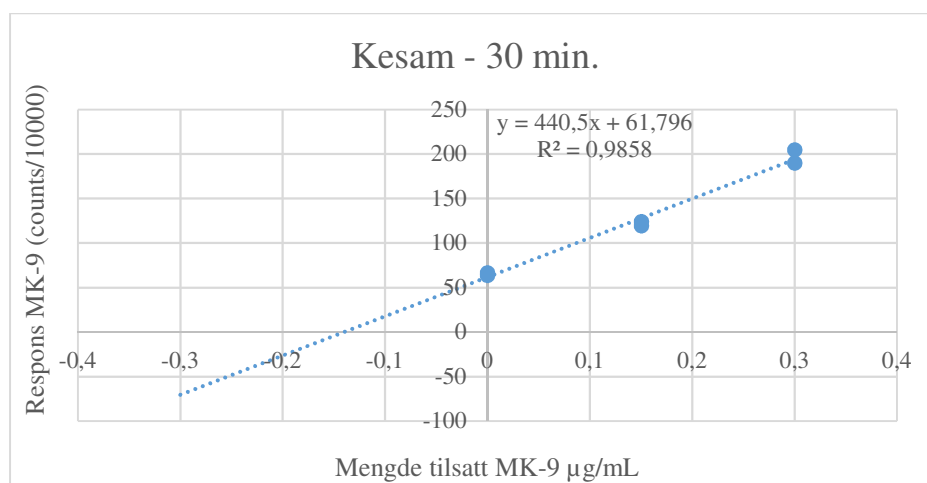
Rør type	MK-9 tilsatt prøve (µg)	Signal K1	Signal MK-9	Beregnet mengde MK-9 (µg/100g)	Gjenvinning % K1	Gjenvinning % MK-9
PP-rør	0	3 861 636,1	280 635,0	7,5		
PP-rør	0,095	3 809 998,0	698 346,2		102,3	96,4
Teflon	0	3 833 007,5	197 347,5	3,9		
Teflon	0,095	3 868 774,2	644 622,3		101,54	115,2

Bruk av heptan som ekstraksjonsmiddel fungerte best i PP-rør sammenlignet med teflonrør (Tabell 7). Tilsetning av heptan til prøven før varmebehandling førte til bedre gjenvinning % for både internstandard K1 og MK-9. Bruk av heptan som ekstraksjonsmiddel istedenfor heksan påvirket ikke utbytte av MK-9 (Tabell 6).

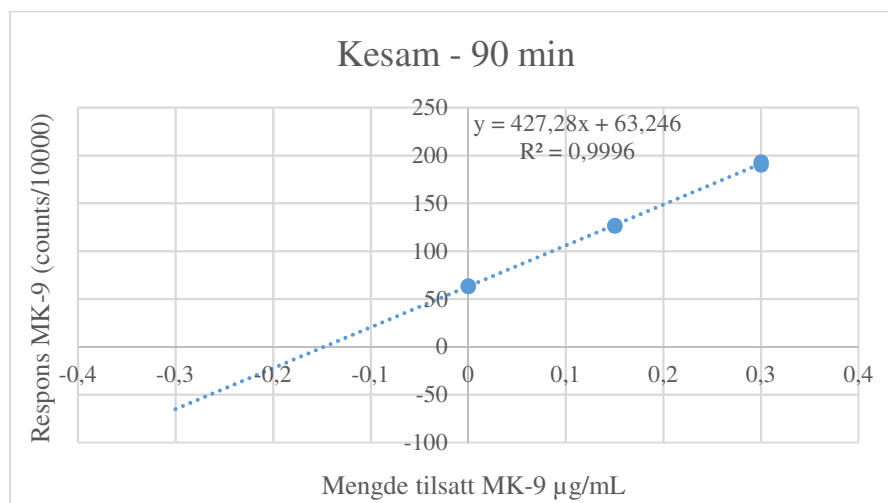
I metoden til Manoury et al. (2013) ble det brukt varmebehandling ved 100°C i 30 min. I den modifiserte metoden ble det valgt oppvarming ved 70°C i 30 minutter. Effekt av 90 minutter varmebehandling av Kesam ved 70°C og utbytte av ekstrahert MK-9 med heptan i 15 mL PP-rør ble testet og resultater ble sammenlignet med utbytte av MK-9 ekstrahert med heptan i 15 mL PP-rør etter varmebehandling ved 70°C i 30 minutter (Tabell 8). Mengde ekstrahert MK-9 ble beregnet på bakgrunn av standard tilsetning metode der signalet fra MK-9 (målt som areal) ble plottet mot mengde MK-9. Mengde MK-9 i prøven ble avlest ved skjæringspunktet mellom regresjonslinjen og x-aksen.

Tabell 8: MK-9 signalet og utbytte av MK-9 fra Kesam varmebehandlet ved 70°C i 30 minutter sammenlignet med MK-9 signalet og utbytte av MK-9 fra Kesam varmebehandlet ved 70°C i 90 minutter (n = 2). Gjen. % = Gjenvinning %

MK-9 tilsatt prøve (µg)	Signal MK-9 30 min	Beregnet mengde MK-9 (µg/100g) 30 min	Gjen. % MK-9 30 min	Signal MK-9 90 min	Beregnet mengde MK-9 (µg/100g) 90 min	Gjen. % MK-9 90 min
0	650194,2	14,03		635690,4	14,80	
0,150	1215047,8			1267776,3		
0,300	1971790,0			1917538,5		
			109,1			101,2



Figur 8: Regresjonskurve ved standard tilsetning for Kesam etter oppvarming av prøver i 30 minutter ved 70 °C. Mengde MK-9 ved y = 0 bestemt til å være 14,02 µg per 100 g prøve.



Figur 9: Regresjonskurven for standard tilsetning for Kesam etter oppvarming av prøver i 90 minutter ved 70 °C. Mengde MK-9 ved y = 0 bestemt til å være 14,80 µg per 100 g prøve.

Ut i fra disse resultatene ble det valgt 15 mL PP-rør istedenfor teflonrør som beskrevet i Manoury et al. (2013), heptan og isopropanol blanding ble tilsatt før varmebehandling, prøvene ble varmebehandlet i en varmeblokk ved 70°C i 30 minutter og heptan ble brukt som ekstraksjonsmiddel av vitamin K2 fra meieriprodukter.

Engangs PP-rør er enklere og billigere å bruke enn teflon-rør. 15 mL PP-rør er mer praktiske å bruke enn 50 mL PP-rør eller glassrør.

Resultater viste at det ble ikke ekstrahert mer MK-9 fra prøvene med 90 minutter og 70°C oppvarmingstid sammenlignet med 30 minutter ved 70°C (Tabell 8).

Metoden for ekstraksjon av vitamin K2 ble utviklet for syrnet melk og ble videre brukt til ekstraksjon av ulike menakinoner fra andre meieriprodukter som Rømme, Crème Fraîche, Kesam, Cottage Cheese og ost (Kapittel 1.1.2 Prøveuttak).

4.2 Test av ulike kolonner og valg av mobilfase

Det ble testet 3 ulike C18-kolonner totalt (Hypersilt Gold 100 x 4,6 mm kolonne, YMC Triart C18 plus 100 x 4,6 mm kolonne og Shiseido Capcell pak C 18 MGII 100A 3 µm, 2,0 x 100 mm kolonne), og mobilfase ble variert som følge av det.

Det ble tatt utgangspunkt i mobilfasen til Manoury et al. (2013) som var en 83:17 (vol/vol) blanding av metanol og etanol tilsatt natriumacetat (5 mmol/L), ZnCl₂ (10 mmol/L) og eddiksyre (5 mmol/L). Etanol ble byttet ut med isopropanol i en noe lavere andel. Det ble brukt en blanding av metanol og isopropanol 90 :10 (vol/vol) som ble tilsatt sinkklorid (10 mmol/L), natriumacetat (5 mmol/L) og eddiksyre (5 mmol/L).

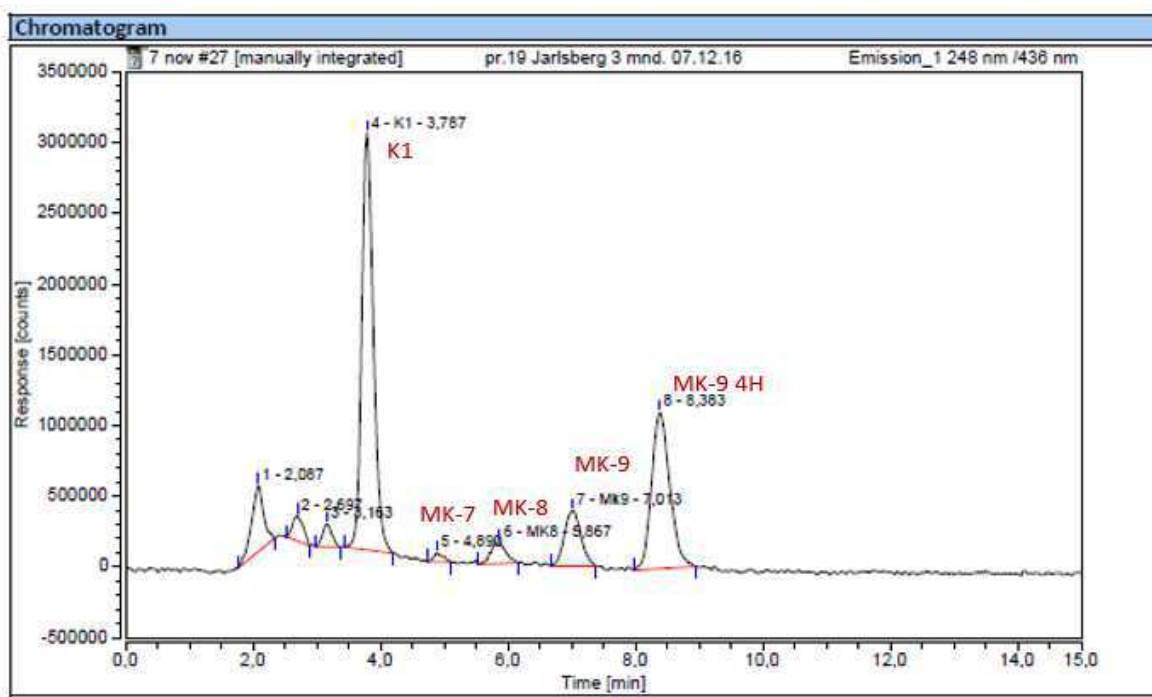
Til sinkreduksjonskolonnen ble det brukt mobilfase beskrevet ovenfor. Vitamin K ble holdt tilbake på C18 fra Shiseido, og andel isopropanol i mobilfasen ble derfor økt. Kolonnen har mindre diameter (2,0 x 100 mm), og flow ble derfor redusert fra 1,4 mL til 0,2 mL/minutt. Manuelt pakket sink kolonne (PEEK, 4 mm i diameter, 50 mm lengde) ble erstattet med Shiseido reduksjonskolonne (CQ-R (2,0 mm id x 20 mm)). Dermed kunne sinkklorid og eddiksyre fjernes fra mobilfasen. Ulike blandingsforhold for metanol og isopropanol ble testet (5%, 10% og 50% isopropanol). Økt mengde isopropanol (fra 10% til 50%) i mobilfasen førte til kortere analysetid ved HPLC.

Strømningshastigheten på 1,4 ml/minutt ved bruk av Hypersil Gold kolonne ble endret til 0,2 ml/minutt som følge av overgang til Shiseido Capcell pack C18 kolonne.

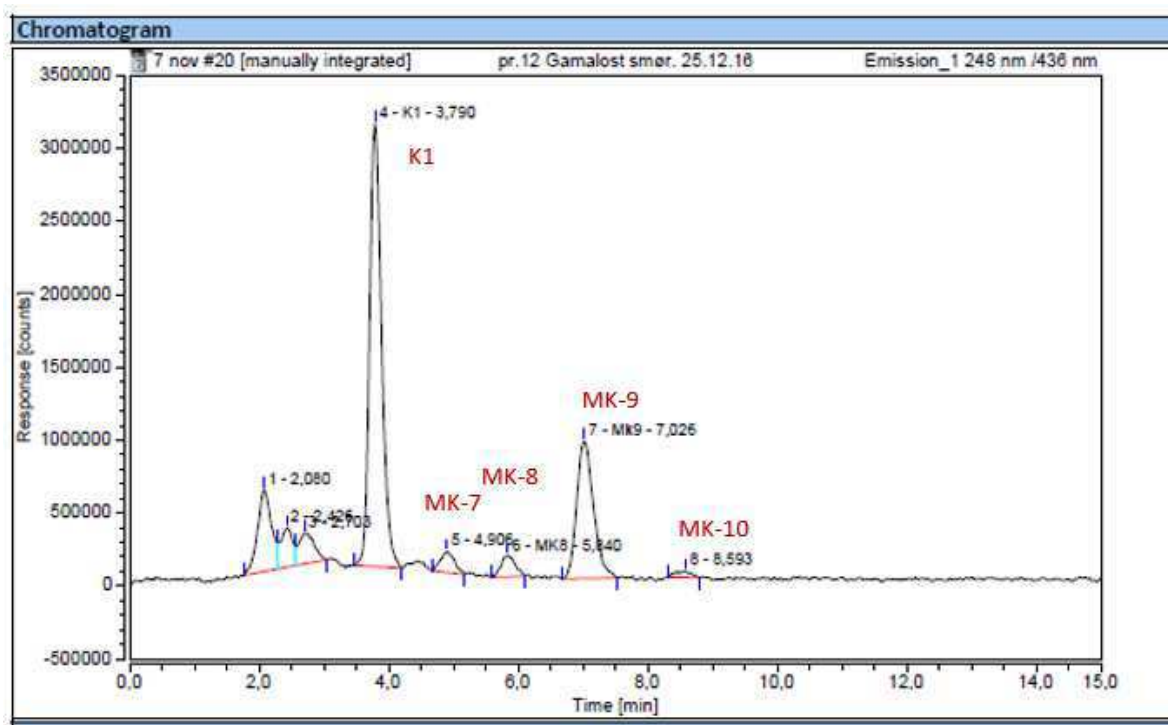
Det ble oppnådd en god separasjon av de ulike vitamin K: vitamin K1, MK-7, MK-8, MK-9, MK-9 4H og MK-10 (Figur 10 og Figur 11). Tabell 9 viser retensjonstid for vitamin K1 og de ulike menakinoner.

Tabell 9: Retensjonstid for ulike menakinoner i meieriprodukter

Menakinon	Retensjonstid (min)
Vitamin K1	3,78
MK-7	4,90
MK-8	5,87
MK-9	7,10
MK-9 4H	8,40
MK-10	8,60



Figur 10: Kromatogram som viser topper for internstandard K1 (RT=3,790) og ulike menakinoner identifisert ved retensjonstid (RT) MK-7 (RT=4,890), MK-8 (RT=5,867), MK-9 (RT=7,013) og MK-9 4H (RT=8,383), ekstrahert fra Jarlsberg ost lagret 3 måneder, eluert på en Shiseido kolonne.



Figur 11: FLD kromatogram med internstandard K1 (RT=3,790) og ulike menakinoner identifisert ved retensjonstid (RT) MK-7 (RT=4,906), MK-8 (RT=5,840), MK-9 (RT=7,026) og MK-10 (RT=8,593) ekstrahert fra smørbar Gamalost, eluert på en Shiseido kolonne.

4.3 Kvantifisering av vitamin K

4.3.1 UV – bestemmelse av konsentrasjon i standardprøvene

Vitamin K-konsentrasjon ble bestemt ved UV-måling. Absorpsjonskoeffisienten for alle vitamin K variantene er oppgitt i litteraturen til $\epsilon = 18900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ved 248 nm, (Dunphy and Brodie, 1971).

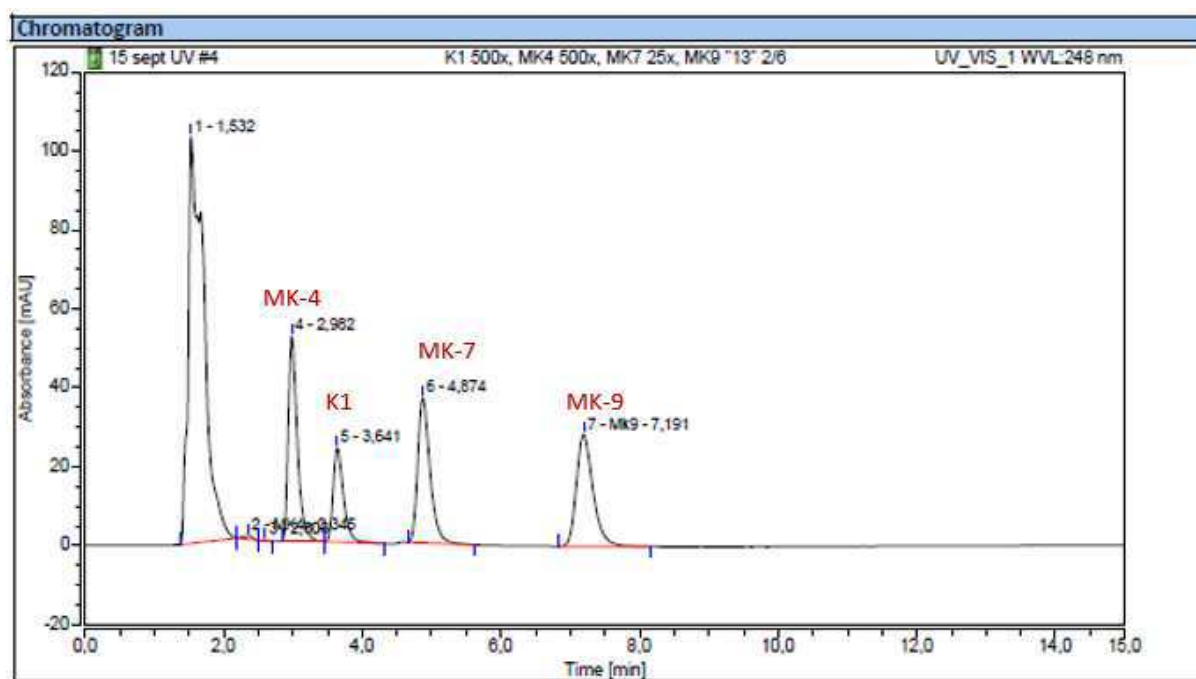
MK-8 og MK-9 4H standardprøve ble laget. MK-8 ble ekstrahert fra *E. coli*, dyrket anaerobt (Unden, 1988), mens MK-9 4H ble ekstrahert fra *Propionibacterium freudenreichii*, dyrket starterkultur for Jarlsberg (Hojo et al., 2007). Cellene ble sentrifugert ned, vasket og suspendert i 1 mL ultra rent Milli Q vann før de ble ekstrahert etter metoden beskrevet i kapittel 1.1.5. Konsentrasjon ble deretter bestemt ved UV-deteksjon. For MK-8 ble den bestemt til å være 2,41 $\mu\text{g/mL}$ og for MK-9 4H til å være 3,40 $\mu\text{g/mL}$ (Tabell 10).

Konsentrasjon i standardprøvene, K1, MK-4, MK-7 og MK-9 ble beregnet etter veid mengde av standardprøvene og sammenlignet med konsentrasjon beregnet ved UV-måling. Resultater

viser godt samsvar mellom vekt og UV-bestemt konsentrasjon i standardprøvene (resultater ikke vist her).

Tabell 10: Konsentrasjon til standardprøve MK-8 og MK-9 4H bestemt ved UV-deteksjon.

UV respons MK-8	UV respons MK-9 4H	Beregnet konsentrasjon i løsning ($\mu\text{g/mL}$)
3,179		2,41
	4,058	3,40



Figur 12: Blanding av ulike standardprøver (K1, MK-4, MK-7 og MK-9) målt ved UV-deteksjon ved 248 nm.

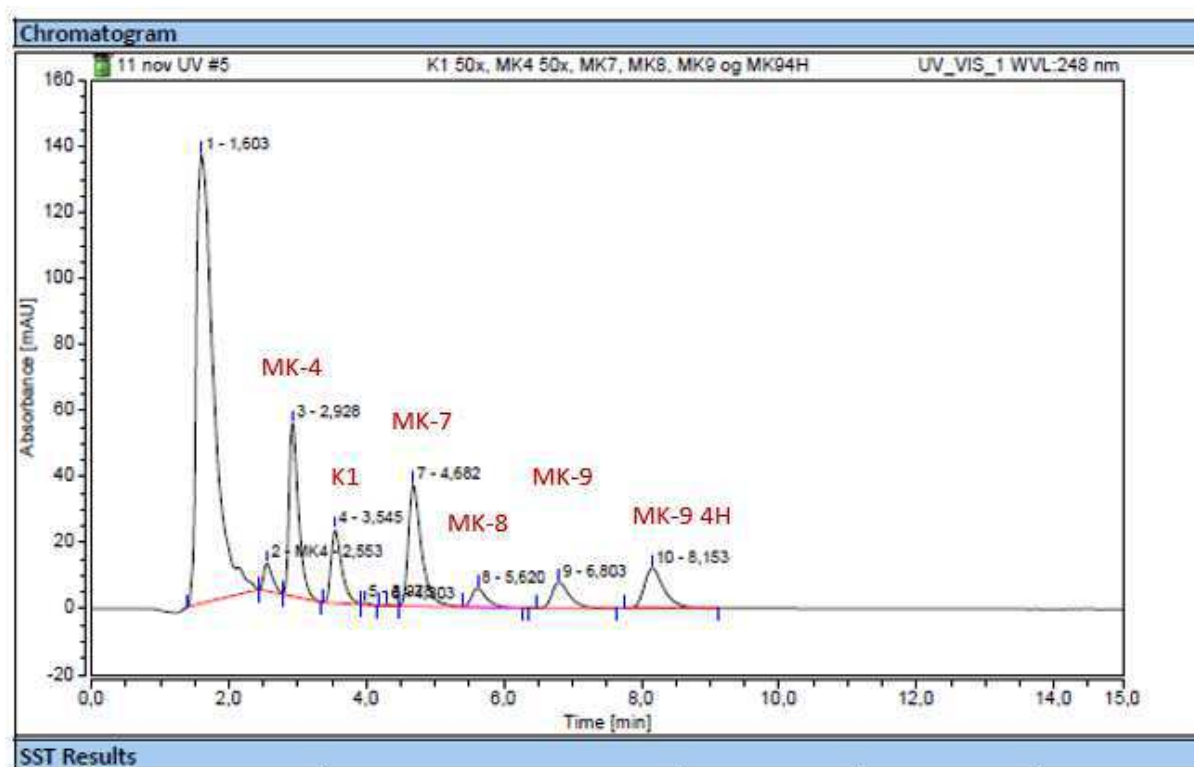
4.3.2 Responsfaktor i fluorescensdetektor

FLD responsfaktor ble bestemt ved å lage en kjent blanding av standardprøver og målt ved FLD som antall counts. FLD responsfaktor er signalet for den enkelt komponent relatert til stoffmengde. Responsfaktor i fluorescensdetektor ble målt og bestemt for de ulike standardprøvene (Tabell 11).

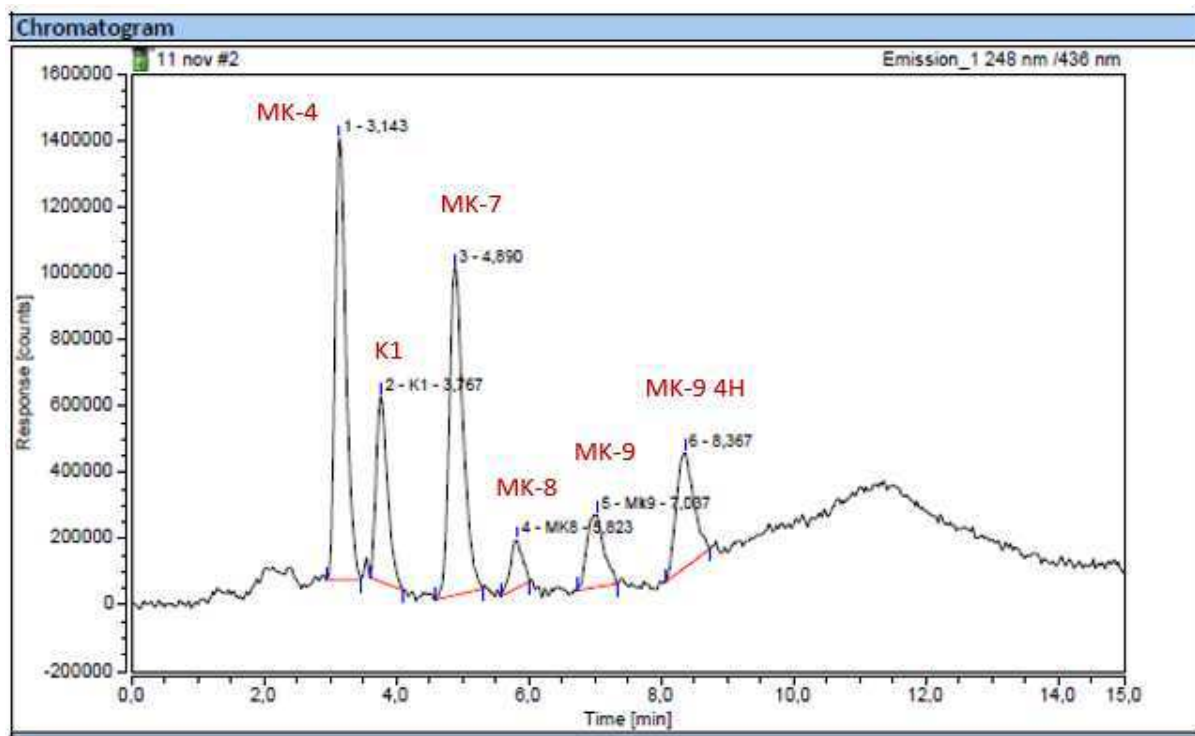
Tabell 11: Responsfaktor for ulike vitamin K

Vitamin K	μmol injisert	counts	FLD responsfaktor (counts/ μmol)
MK-4	1,76E-06	275 613,4	1,57E+13
K1	8,54E-07	115 476,9	1,35E+13
MK-7	1,75E-06	249 450,6	1,43E+13
MK-8	2,93E-07	36 380,5	1,24E+13
MK-9	4,90E-07	65 416,7	1,34E+13
MK-9 4H	8,59E-07	112 012,1	1,30E+13

Resultater viser alle vitamin K: vitamin K1, MK-4, MK-7, MK-8, MK-9, MK-9 4H i blanding som gir tilnærmet samme respons per 1 μmol stoff. Alle standardprøvene ble kjørt med nøyaktig samme detektor innstillingene dvs. sensitivitet 8.



Figur 13: En blanding av ulike standardprøver (K1, MK-4, MK-7, MK-8, MK-9 og MK-9 4H) målt ved UV-deteksjon ved 248 nm. Injeksjonsvolum 10 μL .



Figur 14: En blanding av ulike standardprøver (K1, MK-4, MK-7, MK-8, MK-9 og MK-9 4H) målt ved FLD ved 248/436 nm og sensitivitet 8. Prøven fortynnet 100x i forhold til UV måling, injeksjonsvolum 0,2 μ L. Mengde stoff injisert vist i Tabell 11.

4.3.3 Internstandard metode og standard tilsetning med og uten internstandard.

For måling av vitamin K2 i syrnet melk ble mengde MK-9 i prøvene bestemt på tre ulike måter:

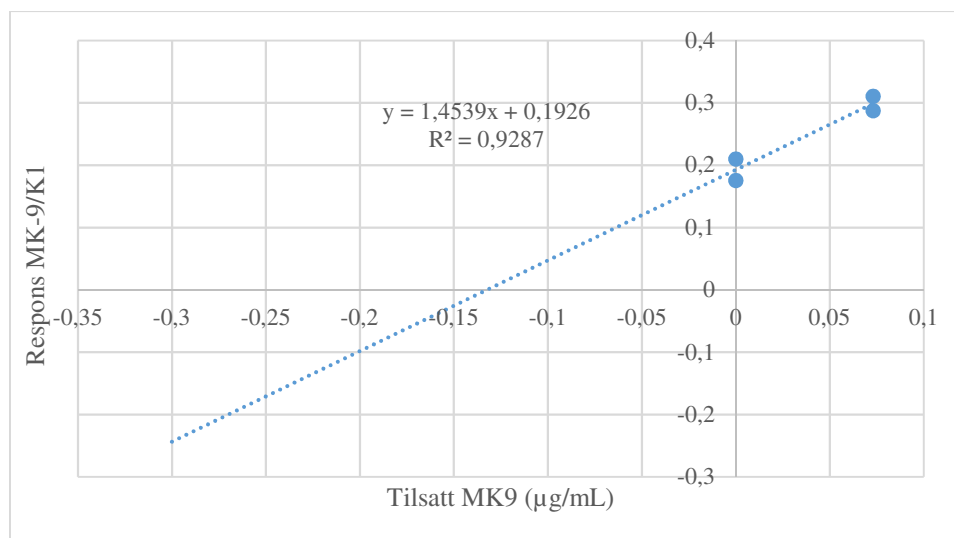
1. ved å bruke internstandard metode og responsfaktor
2. ved å bruke standard tilsetning med internstandard
3. ved å bruke standard tilsetning uten internstandard.

Tabell 12: Signalet for K1, MK-9 og mengde MK-9 i syrnet melk A og B ble beregnet etter internstandard metode og responsfaktor ($n=2$).

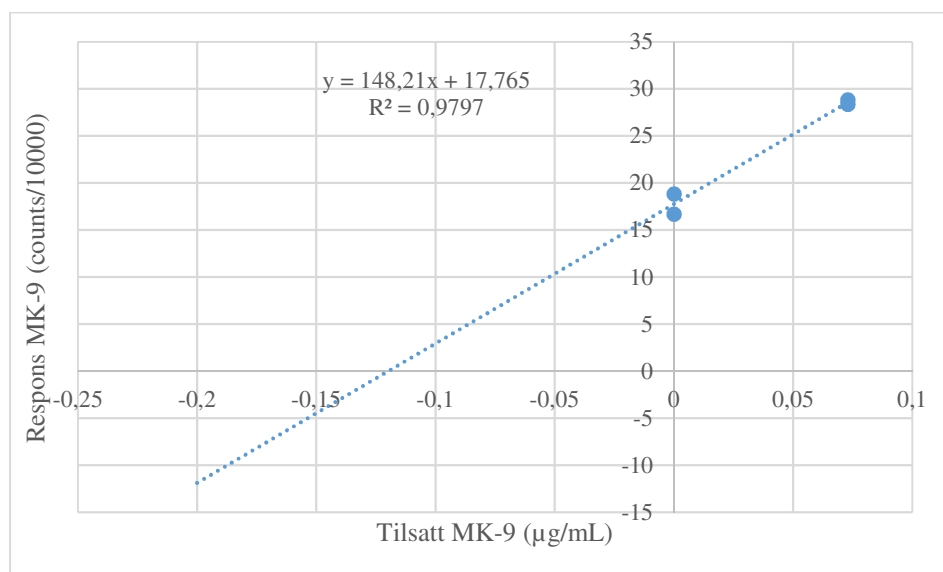
Prøve og mengde MK-9 tilsatt (μ g)	Signal K1	Signal MK-9	Beregnet mengde MK-9 (μ g/100 g)
Syrnet melk A, 0	924 525,1	177 648,3	13,43
Syrnet melk A, 0,073	957 845,7	285 838,0	
Syrnet melk B, 0	977 188,2	143 078,0	10,20
Syrnet melk B, 0,073	1 038 324,0	256 544,2	

Tabell 13: Signalet for K1, MK-9 og mengde MK-9 beregnet etter standard tilsetning med og uten internstandard i syrnet melk A (n=2).

Mengde tilsatt MK-9 (µg)	Signal K1	Signal MK-9	Beregnet mengde MK-9 med internstandard (µg/100 g)	Beregnet mengde MK-9 uten internstandard (µg/100 g)
0	924 525,1	177 648,3	13,25	11,99
0,073	957 845,7	285 838,0		



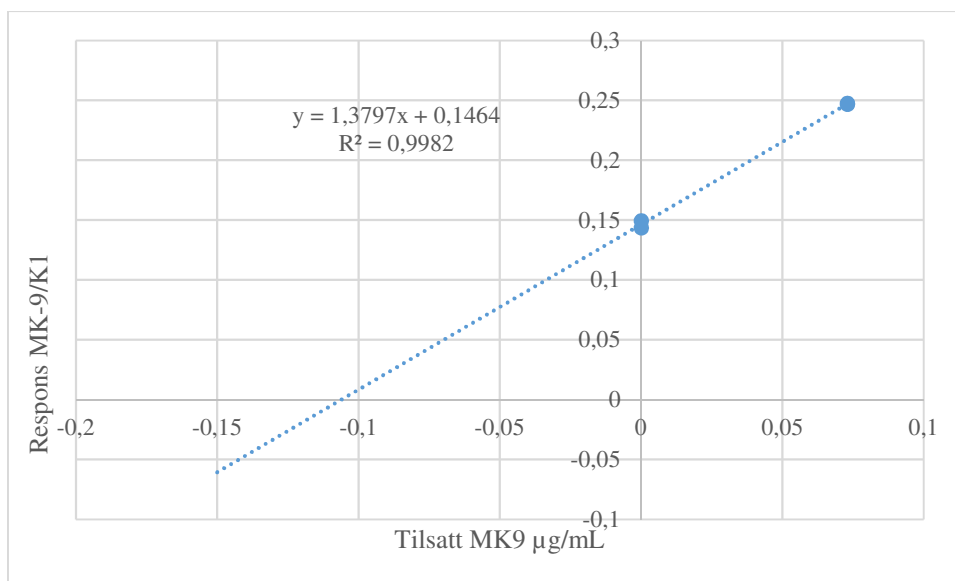
Figur 15: Regresjonskurve ved standard tilsetning med internstandard for syrnet melk A. Mengde MK-9 i prøven avlest ved skjæringspunkt mellom regresjonslinjen og x-aksen og bestemt til å være 13,25 µg per 100 g prøve.



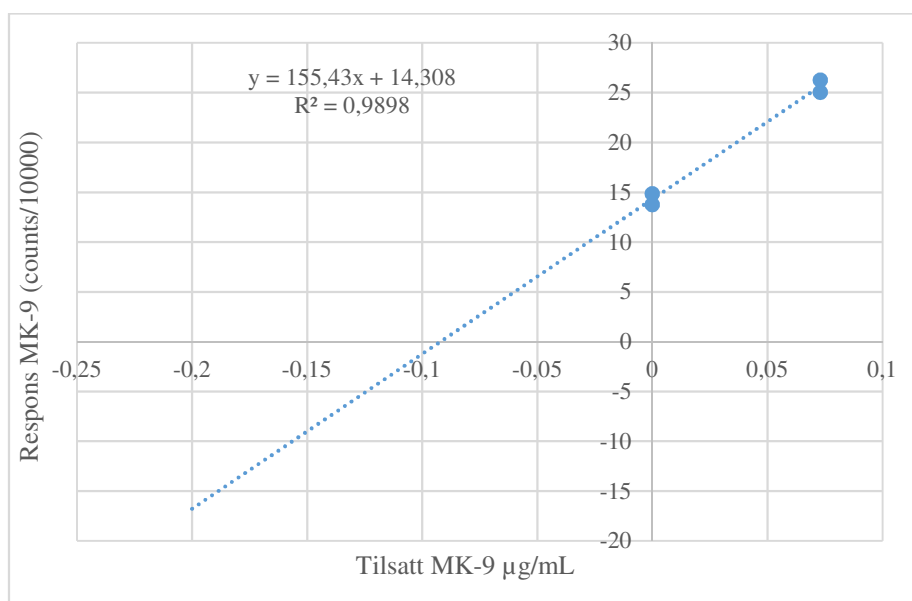
Figur 16: Regresjonskurve ved standard tilsetning uten internstandard for syrnet melk A. Mengde MK-9 i prøven avlest ved skjæringspunkt mellom regresjonslinjen og x-aksen og bestemt til å være 11,99 µg per 100 g prøve.

Tabell 14: Signalet for K1, MK-9 og mengde MK-9 beregnet etter standard tilsetning med og uten internstandard for syrnet melk B (n=2).

Mengde tilsatt MK-9 (µg)	Signal K1	Signal MK-9	Beregnet mengde MK-9 med internstandard (µg/100 g)	Beregnet mengde MK-9 uten internstandard (µg/100 g)
0	977 188,2	143 078,0	10,61	9,21
0,073	1 038 324,0	256 544,2		



Figur 17: Regresjonskurve ved standard tilsetning for syrnet melk B. Mengde MK-9 i prøven avlest ved skjæringspunkt mellom regresjonslinjen og x-aksen og bestemt til å være 10,61 µg per 100 g prøve.



Figur 18: Regresjonskurve ved standard tilsetning uten intern standard for syrnet melk B. Mengde MK-9 i prøven avlest ved skjæringspunkt mellom regresjonslinjen og x-aksen og bestemt til å være 9,21 µg per 100 g prøve.

Tabell 15: Sammenligning av mengde MK-9 ($\mu\text{g}/100\text{g}$) ekstrahert fra syrnet melk A og syrnet melk B beregnet etter internstandard metoden og standard tilsetning. MK-9 gjenvinning % beregnet etter standard tilsetning metode.

	Mengde MK-9 beregnet	Syrnet melk A	Syrnet melk B
1	Etter internstandard metode	13,42	10,20
2	Etter standard tilsetning med internstandard	13,25	10,61
3	Etter standard tilsetning uten internstandard	11,99	9,21
1	K1 Gjenvinning %	101,3	107,1
2	K1 Gjenvinning %	105,0	113,8
2	MK-9 Gjenvinning%	100,1	105,0

Resultater viser at mengde MK-9 beregnet etter internstandard metode er lik mengde MK-9 beregnet etter standard tilsetning med internstandard for både syrnet melk A og syrnet melk B.

Mengde MK-9 beregnet etter standard tilsetning uten internstandard er noe lavere sammenlignet med internstandard metode og standard tilsetning med intern standard.

4.4 Kartlegging av vitamin K2-innhold i TINEs produkter

Det ble målt total mengde vitamin K2 fordelt på ulike menakinoner i ulike TINEs produkter.

4.4.1 Fermenterte melkeprodukter

Mengde MK-8, MK-9 og total mengde vitamin K2 i kefir og Kulturmilk med ulik fettprosent, ble målt (Tabell 16). Verdiene er gjennomsnittet av 3 produksjoner og to parallelle uttak fra hver kartong.

Tabell 16: Oversikt over mengde MK-8, MK-9 og total mengde vitamin K2 i kefir og Kulturmelk (n = 3).

	Fett i produkt (%)	MK-8 (µg/100g)	Standard avvik	MK-9 (µg/100g)	Standard avvik	Totalt vitamin K2 (µg/100g)	Standard avvik
Kulturmelk	3,5	1,1	0,1	7,3	0,7	8,4	0,8
Lett Kulturmelk	1,2	0,7	0,5	7,3	1,0	7,9	1,3
Skummet Kulturmelk	0,5	1,8	0,2	10,2	0,5	11,9	0,6
Kefir Økologisk	3,5	1,1	0,1	10,2	0,3	11,3	0,4

Kulturmelk og kefir inneholdt mest MK-9 og noe mindre av MK-8. MK-7 ble ikke detektert. Standardavvik mellom produksjoner var relativt lav.

Mengde MK-8, MK-9 og total mengde vitamin K2 i Crème Frâiche og rømme med ulike fettprosent er vist i Tabell 17.

Tabell 17: Oversikt over mengde MK-8, MK-9 og den totale mengde vitamin K2 i ulike Crème Frâiche og rømme produkter (n = 3).

	Fett i produkt (%)	MK-8 (µg/100g)	Standard avvik	MK-9 (µg/100g)	Standard avvik	Totalt vit. K2 (µg/100g)	Standard avvik
Crème Frâiche original	35	1,1	0,5	6,9	0,4	8,0	0,9
Crème Frâiche lett	18	1,4	0,3	7,5	0,4	8,9	0,7
Crème Frâiche lett	10	1,4	0,4	8,1	0,8	9,5	1,1
Seterrømme	35	0,9	0,5	6,7	0,4	7,6	0,8
Lettrømme	18	1,9	0,3	9,5	1,4	11,4	1,7
Lettrømme	10	1,9	0,3	8,4	0,5	10,3	0,8
Lettrømme økologisk	18	1,3	0,2	8,1	0,6	9,4	0,5
Rømmekolle	10	1,9	0,1	10	1,6	12	1,6
Lettrømme laktosefri	18	1,4	1,2	8,3	0,5	9,6	1,7

MK-7 ble ikke detektert. Relativ standardavvik mellom produksjoner var liten.

Tabell 18 viser mengde MK-8, MK-9 og totale mengde vitamin K2 i kesam og Cottage Cheese, med ulikt fettinnhold. Det var mest MK-9, mens MK-8 utgjorde omtrent 20% av total mengde vitamin K2. MK-7 ble ikke detektert. Cottage Cheese inneholdt nesten dobbelt så mye vitamin K2 som kesam. Det registreres ingen store forskjeller i mengde vitamin K2 i produktene med høyere fettinnhold og produktene med lavere fettinnhold. Resultatene viste større standardavvik og større variasjoner mellom ulike produksjoner av kesam og Cottage Cheese enn mellom ulike produksjoner av Kulturmilk og kefir eller rømme og Crème Fraiche.

Tabell 18: Mengde MK-8, MK-9 og den totale mengde vitamin K2 i ulike kesam og Cottage Cheese produkter (n=3).

	Fett i produkt (%)	MK-8 (µg/100g)	Standard avvik	MK-9 (µg/100g)	Standard avvik	Totalt vit. K2 (µg/100g)	Standard avvik
Kesam original	7,1	3,6	0,4	16,6	1,4	20,3	1,7
Kesam mager	1	5,6	2,2	17,7	1,3	23,3	2,0
Kesam mager laktosefri	1	4,3	0,8	18,7	2,2	23,1	2,8
Cottage Cheese original	4,3	5,9	0,2	31,1	3,1	37	3,3
Cottage Cheese mager	2	7,3	1,6	38,7	8,6	46	10,2
Cottage Cheese fettfri	0,4	5,6	0,3	27,3	2,1	32,9	2,3

4.4.2 Ost

Resultater i Tabell 19 viser innholdet av total mengde vitamin K2 og de ulike menakinoner i ulike varianter av blåmuggost. Blåmuggost inneholdt både MK-7, MK-8 og MK-9. MK-9 innholdet var høyest i Norzola og Normanna og lå på ca. 24 µg per 100 g produkt. I Selbu Blå, Selbu Blå Kraftig (modnet ost) og Fryd Royal Blue (mild ost) var MK-9 nivået noe lavere, rundt 13-14 µg per 100 g produkt. MK-8 utgjorde ca. 20-30 % av MK-9 innholdet. Alle blåmuggostene inneholdt MK-7, som var forskjellig fra andre oster, men i Selbu Blå var nivå av gjennomsnitt for MK-7 veldig høyt, over 60 µg per 100 g produkt. Stort standardavvik på Selbu Blå skyldtes stor variasjon i mengde MK-7, som varierte fra 3,5 µg til 131,6 µg per 100g.

Tabell 19: MK-7, MK-8, MK-9 og den totale mengde vitamin K2 i ulike blåmuggostene (n=3).

	MK-7 (µg/100g)	Standard avvik	MK-8 (µg/100g)	Standard avvik	MK-9 (µg/100g)	Standard avvik	Total vitamin K2 (µg/100g)	Standard avvik
Selbu Blå	60,2	65,3	5,5	1,1	12,7	1,5	78,4	64,4
Norzola	4,2	0,8	8,8	0,9	23,7	3,7	36,7	5,1
Selbu Blå Kraftig	4,2	1,2	5,8	1,7	13,5	3,7	23,5	4,3
Fryd Royal Blue	2,4	0,4	5,3	1,3	14,3	3,6	22,1	4,1
Normanna	3,9	1,5	7,6	0,8	24,8	3,4	36,2	2,4

Tabell 20: Mengde MK-7, MK-8, MK-9 og den totale mengde vitamin K2 i ulike varianter av Norvegia ost (n=3).

	MK-7 (µg/100g)	Standard avvik	MK-8 (µg/100g)	Standard avvik	MK-9 (µg/100g)	Standard avvik	Total vitamin K2 (µg/100g)	Standard avvik
Norvegia Fyldig, skivet	0	0	3,8	1,4	14,4	2,7	18,2	4,1
Norvegia Vellagret, skivet	0	0	4,8	0,6	18,7	2,0	23,5	2,1
Norvegia Vellagret	0,6	0	7,3	3,4	22,8	9,4	30,7	12,2
Norvegia Ekstra Vellagret	1	0	5,3	1,9	20,6	2,4	26,9	5,6
Norvegia Original, skivet	0,6	0	3,7	0,9	14,3	1,2	18,6	1,2
Norvegia Lettost, skivet	0	0	3,8	0,3	15,6	1,2	19,5	1,4
Norvegia Økologisk	0	0	4,3	0,6	19,2	1,1	23,5	1,7

Total mengde vitamin K2 og mengden av de ulike menakinonene ekstrahert fra Norvegia ost er vist i Tabell 20.

Norvegia inneholdt både MK-7, MK-8 og MK-9. Norvegia inneholdt mest MK-9. Innholdet til MK-9 varierte mellom hver produksjon, spesielt i Norvegia Vellagret (lagret minimum 9 måneder). Mengde MK-8 utgjorde ca. 20% av MK-9. Innholdet av MK-7 var lav og ble kun detektert i Norvegia Vellagret, Norvegia Ekstra Vellagret (lagret på hjul i 15 måneder) og Norvegia Original (lagret 3 måneder). Det ble ekstrahert like mye vitamin K2 fra Norvegia Original og Norvegia Fyldig. Totalt innhold av vitamin K2 ble målt til 18,2 µg per 100 g prøve i Norvegia Fyldig og 18,6 µg per 100 g produkt i Norvegia Original. Det ble ikke registrert store forskjeller mellom originale produkter (27 g fett per 100 g) og Norvegia Lettere (16 g fett per 100 g). Det ble målt mest vitamin K2 i Norvegia Vellagret og Norvegia Ekstra Vellagret, mens Norvegia Økologisk (23,5 µg per 100 g produkt) inneholdt mer vitamin K2 enn fra Norvegia Original. Norvegia Vellagret og Norvegia Ekstra Vellagret inneholdt mest av vitamin K2.

Total mengde vitamin K2 fordelt på de ulike menakinoner i Sveitser og Jarlsbergost er vist i Tabell 21.

I disse ostene ble det i tillegg til menakinoner som dannes av melkesyrebakterier, MK-8 og MK-9 (Morishita et al., 1999) funnet MK-9 4H, produsert av propionsyrebakterier (Hojo et al., 2007). MK-7 ble ikke detektert i hverken Sveitser eller Jarlsbergost og mengde MK-9 var på omtrent samme nivå som i Norvegia ost. MK-9 4H var den som dominerte og varierte i mengde fra lav, 15 µg per 100 g i Jarlsberg Original (skorpefri ost, lagret like lenge som Jarlsberg Original med skorpe) til veldig høy, 74 µg per 100 g i Jarlsberg Original med skorpe (hjul lagret 3 måneder) og Jarlsberg Vellagret (lagret 12 måneder). Det var stort standardavvik mellom produksjoner. I en av tre batcher av Jarlsberg Original skivet ble det ikke påvist MK-9 4H. Det ble detektert MK-8 og MK-9 men ingen MK-9 4H. Resultatene viser at mengde vitamin K2 i Sveitserost og Jarlsberg øker med økende lagringstid.

Tabell 21: Mengde MK-8, MK-9, MK-9 4H og total mengde vitamin K2 i ulike varianter av Sveitser og Jarlsbergost (n=3).

	MK-8 (µg/100g)	Standard avvik	MK-9 (µg/100g)	Standard avvik	MK-9 4H (µg/100g)	Standard avvik	Total vitamin K2 (µg/100g)	Standard avvik
Sveitser Original	1,4	1,3	7,4	2,5	52,3	10,8	61,3	13,5
Sveitser Vellagret	2,8	0,3	10,8	1,8	74,0	13,6	87,6	15,2
Jarlsberg Original, skivet	5,9	1,2	20,7	1,8	15,8	25,2	42,8	27,4
Jarlsberg Original	7,1	0,4	17,7	2,4	24,0	4,6	48,8	7,3
Jarlsberg med skorpe	9,6	2,4	25,4	3,0	74,3	9,1	109,9	6,8
Jarlsberg Vellagret, med skorpe	3,4	1,9	13,1	3,1	74,6	22,8	91,5	27,5
Jarlsberg Lettost	6,4	0,4	25,7	2,9	20,1	9,0	52,7	10,8

Tabell 22: Mengde MK-7, MK-8, MK-9 og total mengde vitamin K2 i andre typer hvitoster (n = 3).

	MK-7 (µg/100g)	Standard avvik	MK-8 (µg/100g)	Standard avvik	MK-9 (µg/100g)	Standard avvik	Total vitamin K2 (µg/100g)	Standard avvik
Kvitlin	0	0	2,6	2,7	13,7	14,0	16,3	16,0
Norbo	0	0	2,1	2,4	12,3	5,8	14,4	8,1
TINE Gräddost	0,7	1,2	2,5	1,0	13,3	2,1	16,5	4,1
TINE norsk Edamer	0	0	6,4	2,2	22,9	5,3	29,3	7,4
TINE Edamer Vellagret	0	0	4,5	0,1	18,4	3,0	22,9	3,1
TINE Ekte Hvit Geitost	0	0	0	0	3,8	1,0	3,8	1,0
Balsfjord	0	0	3,2	0,4	12,9	3,1	16,0	2,8

Tabell 22 viser totalt innhold av vitamin K2 og fordeling på de ulike menakinoner i andre hvitoster enn Norvegia, Sveitser eller Jarlsberg.

I denne kategorien inngår Kvitlin, Balsfjord og Ekte Hvit Geitost produsert av geitemelk, Norbo (uten animalsk løpe), TINE Gräddost og Edamer ost både den originale (lagret minimum 8-10 måneder) og den vellagret (lagret minimum 15 måneder). Resultater viser store variasjoner og store forskjeller mellom produksjoner og mellom de ulike produktgrupper. I noen oster som i Kvitlin ble det ikke detektert vitamin K2 (MK-7, MK-8, MK-9 ble ikke detektert i en av tre produksjoner) som igjen ga stort standardavvik. MK-7 ble kun påvist i TINE Gräddost. MK-8 ble påvist i alle oster unntatt TINE Ekte Hvit Geitost. Nivå av MK-9 i TINE Ekte Hvit Geitost var lavest sammenlignet med de andre ostene produserte med geitemelk. Innholdet av total mengde vitamin K2 i Edamerostene var på omtrent samme nivå som i Norvegiaostene.

Resultater i Tabell 23 viser total konsentrasjon av vitamin K2 og konsentrasjon av de ulike menakinoner i hvitmuggost, kittmodnet ost og kremoster.

TINE Økologisk Brie var den eneste hvitmuggosten som inneholdt vitamin K2 og totalt innhold var høyt, 48,7 µg per 100g produkt. Hverken menakinon MK-7, MK-8 eller MK-9 ble detektert i noen av de andre hvitmuggostene (Snøhetta, TINE Camembert eller Fryd Brie).

Kittmodnet ost, Ridder og Port Salut, inneholdt mest MK-9, noe mindre MK-8 og MK-7. Total mengde vitamin K2 i kittmodnet ost var på omtrent samme nivå som i Norvegia.

MK-9 var detektert i alle kremoster, mens MK-8 ble detektert kun i Snøfrisk naturell. MK-7 ble ikke detektert i noen kremost.

Tabell 23: Mengde MK-7, MK-8, MK-9 og total mengde vitamin K2 hvitmuggost, kittmodnet ost og ulike kremoster (n = 3).

	MK-7 (µg/100g)	Standard avvik	MK-8 (µg/100g)	Standard avvik	MK-9 (µg/100g)	Standard avvik	Total vitamin K2 (µg/100g)	Standard avvik
TINE Økologisk Brie	4,5	1,1	9,4	2,2	34,8	3,9	48,7	6,8
Snøhetta	0	0	0	0	0	0	0	0
Fryd Brie	0	0	0	0	0	0	0	0
TINE Camembert	0	0	0	0	0	0	0	0
Ridder	0,8	1,3	5,2	1,5	17,1	2,9	22,7	3,1
Port Salut	0,5	0,8	6,5	1,6	25,0	6,4	31,9	7,3
TINE Kremost Naturell	0	0	0	0	6,2	0,4	6,3	0,5
Snøfrisk Naturell	0	0	0	0	8,7	0,9	8,7	0,9
Snøfrisk Lett Naturell	0	0	1,7	0,7	13,4	2,4	15,1	3,1

Tabell 24: Mengde MK-7, MK-8, MK-9, MK-10 og total mengde vitamin K2 i norsk tradisjonsost (n = 3). Std.avvik = Standard avvik

	MK-7 (µg/100g)	Std. avvik	MK-8 (µg/100g)	Std. avvik	MK-9 (µg/100g)	Std. avvik	MK-10 (µg/100g)	Std. avvik	Total vitamin K2 (µg/100g)	Std. avvik
Gamalost frå Vik (n=4)	10,7	3,4	10,1	1,9	97,0	12,4	6,0	0,4	123,8	14,9
Gamalost frå Vik, smørbar (n=4)	6,4	1,9	8,2	2,1	66,5	21,0	4,3	1,6	85,4	26,5
TINE Pultost Hedmark	9,6	3,7	11,9	2,1	38,1	2,4	0	0	59,6	3,5
TINE Pultost Løiten	5,5	0,5	11,0	1,8	45,0	9,2	0	0	61,5	10,9
Chevre Naturell Haukeli	2,7	4,7	7,2	1,9	58,7	8,3	0	0	68,6	11,2
Chevre Ramsløk Haukeli	0	0	6,3	1,1	44,5	3,3	0	0	50,8	10,5
Chevre Original Haukeli	8,2	6,5	14,6	2,1	85,4	25,2	0	0	108,1	23,5

Tabell 24 viser innholdet av vitamin K2 i norsk tradisjonsost som Gamalost og Pultost, og i Chevre.

Resultatene for Gamalost viser gjennomsnittet for fire produksjoner, mens for Pultost og Chevre er det gjennomsnittet av tre produksjoner. Resultatene viser høyt innhold av vitamin K2 i alle ostene. Alle oster, unntatt Chevre Ramsløk Haukeli inneholdt mye MK-9, noe mindre MK-8 og MK-7. MK-7 ble ikke detektert i Chevre Ramsløk Haukeli. Gamalost, inneholdt trolig i tillegg til MK-7, MK-8, MK-9 også MK-10.

4.5 Dyrking i fermentor

En kommersiell kultur ble testet for produksjon av vitamin K2 i skummetmelk ved 25°C. pH ble stabilisert med 2N NaOH og 1N Na₂CO₃. Vitamin K2-innholdet ble målt ved bruk av metoden beskrevet i kapittel 1.1.5.

Tabell 25: Mengde MK-9 og antall bakterier målt i skummet melk under fermentering ved konstant pH ved 25°C. pH ble stabilisert ved 2N NaOH.

Forsøk nr.	Fermentering ved pH	Beregnet mengde MK-9 (µg/100g)	Mengde 2N NaOH tilsatt (mL)	Antall bakterier (cfu/mL)
1	6,5	19,17	98,88	1,90E9
2	6,0	19,09	96,03	3,95E9
3	5,5	11,68	91,95	9,40E8
4	5,0	6,83	39,46	4,10E8
5	6,5	19,23	95,86	1,60E9
6	6,0	15,17	91,44	1,10E9
7	5,5	11,84	95,99	6,50E8
8	5,0	6,21	42,69	6,20E8

Tabell 26: Mengde MK-9 og antall bakterier målt i skummet melk under fermentering med konstant pH ved 25°C. pH ble stabilisert ved 1N Na₂CO₃.

Forsøk nr.	Fermentering ved pH	Beregnet mengde MK-9 (µg/100 g)	Mengde 1N Na ₂ CO ₃ tilsatt (mL)	Antall bakterier (cfu/mL)
9	6,5	4,86	100,00	2,50E9
10	6,0	5,13	100,00	3,80E9
11	5,5	7,21	88,35	1,33E9
12	5,0	7,99	35,33	7,80E8
13	6,5	7,91	100,00	4,06E9
14	6,0	8,22	94,60	
15	5,5	6,96	69,52	8,50E8
16	5,0	8,01	28,20	1,30E9

Tabell 27: Mengde MK-9 og antall bakterier målt i skummet melk under fermentering ved 25°C uten pH kontroll.

Forsøk nr.	Start pH	Slutt pH	Beregnet mengde MK-9 (µg/100 g)	Antall bakterier (cfu/mL)
17	6,88	4,4	2,52	2,30E8
18	6,84		3,26	2,50E8
19	6,86		2,97	

Resultatene i Tabell 25 viser at det ble produsert mer vitamin K2 og flere bakterieceller ved pH 6,5 og 6,0 enn ved pH 5,5 og 5,0 i skummet melk der pH ble stabilisert med 2N NaOH. Antall bakterieceller er like høyt i melk der pH ble stabilisert med 1N Na₂CO₃ men konsentrasjon av MK-9 er betydelig lavere (Tabell 26). Det ble produsert mer MK-9 og det ble målt dobbelt så mange celler i melk tilsatt 1N Na₂CO₃ ved pH 5,0. Mengde MK-9 og antall celler er mye lavere i skummet melk uten pH kontroll enn i melk med pH-kontroll (Tabell 27).

5 Diskusjon

5.1 Om metoden

Valg av ekstraksjonsmetode har stor betydning for mengde påvist vitamin K2.

Det ble tatt utgangspunkt i en publisert metode fra Manoury et al. (2013). Metoden benytter et enkelt og raskt rensetrinn for å fjerne matrikskomponenter. Det ble gjort en serie med forsøk

og ulike parametere ble testet, blant annet type rør, temperatur i vannbadet eller i varmeblokk, varmebehandlingstid av prøver og valg av ekstraksjonsmiddel. Det ble etablert en metode som er ganske forskjellig fra metoden til Manoury et al. (2013). Den nye metoden er rask sammenlignet med metoder som bruker lipasebehandling av prøver (Koivu-Tikkanen, 2001). Den er enkel og påviser mer vitamin K₂ i produktene enn metoder som er brukt hos kommersielle, eksterne laboratorier. Noen av prøvene ble sendt til kommersielle, eksterne laboratorier for å sammenligne resultater (Resultat ikke vist her).

Innledningsvis ble det brukt PP-rør (50 mL) og ikke teflonrør som beskrevet i Manoury et al. (2013). Glass-rør, teflon-rør og PP-rør (15 mL) ble også testet. Resultatene viser at valg av rør kan ha en betydning for mengde påvist vitamin K₂.

Det ble testet tre ulike C18 silika kolonner med ulik mobilfase. Konsentrasjon av isopropanol ble justert for å få en god separasjon uten at det tok for mye tid. Ved overgang til mindre separasjonskolonne fra Shiseido ble analysetiden forkortet (ca. 15 minutt istedenfor ca. 30 minutt) og mengde løsemiddel ble redusert.

Den kjemiske reduksjon av vitamin K ble utført etter separasjon, først med en manuelt pakket sink-reduksjonskolonne og senere med reduksjonskolonne fra Shiseido. Sink ble brukt for å redusere den oksyderte prøven og for å få en fluoriserende effekt. Bruk av «hjemmelaget» sink kolonne var tungvint på grunn av begrenset holdbarhet. Den ga best signal når den var nypakket. Etter større antall prøver ble signalene svakere og søylen ble brukt opp. Sink-kolonnen måtte tømmes og pakkes på nytt minst hver uke. Overgang til Shiseido reduksjonskolonne førte til en betydelig forenkling av metoden og forkortet analysetiden ytterligere. Shiseido reduksjonskolonne ga lik respons som fersk sink-kolonne.

Mengde internstandard beskrevet i metoden til Manoury et al. (2013) ble for stor, ca. 1 µg/mL i ekstrakt, og følsomhet på detektor ble justert fra 4 til 8.

Alle standardløsninger: K1, MK-4, MK-7, MK-8, MK-9 og MK-9 4H, ble oppbevart i fryser, men på grunn av utkrystallisering og utfelling ble de temperert før fortyninger ble laget. Både standardløsninger og prøvene ble skjermet for lys under prøvebearbeiding. Forsøkene har vist at tynne løsninger av MK-9 fordampet eller har tapt seg underveis, særlig hvis de var løst i metanol. MK-9 fortynnet i heptan var mer stabilt.

Tilsetning av heptan direkte til prøven, før tilsetning av isopropanol blanding og varmebehandling viste seg å ha en positiv effekt for total mengde ekstrahert vitamin K₂ fra

prøvene gjennom bedre recovery for både K1 og MK-9. Bruk av en blanding bestående av isopropanol, HCl og internstandard viste seg å være bedre enn pipetteringer og tilsetning av stoffer hver for seg. Måleusikkerhet ble redusert og det ble oppnådd god repeterbarhet av analyseresultater.

De ulike menakinoner (MK-7, MK8, MK-9, MK-9 4H og MK-10) ble identifisert ved RT sammenlignet med RT for standardprøvene med unntak for MK-10 (kun RT, ingen standardprøve) (Tabell 9).

Konsentrasjon i de tillagde standardprøvene (MK-8 og MK-9 4H) ble bestemt ved UV-måling og responsfaktor. Mengde ble deretter korrigert med molekylmasse.

Kvantifisering av alle menakinoner ble basert på standardkurve med internstandard K1 og standardkurve for standard tilsetning med og uten internstandard K1.

Menakinon MK-10 ble bestemt ved RT. Det ble antatt at det var MK-10 siden den kommer etter MK-9 4H og det at det er kun *Propionibacterium freudenreichii* som kan produsere dette menakinonet.

5.2 Om resultater fra kartlegging

TINE produserer mange ulike syrna produkter, men ikke alle inneholder vitamin K2.

Produkter som Kulturmelk, kefir, rømme, kesam, Cottage Cheese er fermentert ved hjelp av starterkulturer som inneholder mesofile melkesyrebakterier *Leuconostoc* subsp., og *Lactococcus* subsp. Noen oster er tilsatt starterkulturer med *Leuconostoc* subsp., og *Lactococcus* subsp. og oster som Jarlsberg og Sveitser er i tillegg tilsatt propionsyrebakterier *Propionibacterium freudenreichii*. Det er kjent fra litteraturen at disse stammene produserer vitamin K2 (Hojó et al., 2007, Morishita et al., 1999). Produkter som yoghurt, Biola, Cultura, Mozarella er fermentert med *Lactobacillus* subsp., og *Streptococcus* subsp. Disse melkesyrebakteriene er ikke kjente for å være vitamin K2-produsenter (Morishita et al., 1999) og derfor ble ikke yoghurt, Biola, Cultura og Mozarella tatt med i denne undersøkelsen.

Melkesyrebakterier som *Leuconostoc* subsp., og *Lactococcus* subsp. produserer ulike menakinoner: MK-7, MK-8, MK-9 og trolig MK-10 (Morishita et al., 1999), mens propionsyrebakterier produserer menakinon MK-9 4H (Hojó et al., 2007).

Fermenteringsprosessen i de ulike produktene er forskjellig, avhengig av type produkt, fermenteringstemperatur og tilsatt starterkultur. I tillegg kan det være andre faktorer under produksjon og lagring som kan påvirke innholdet av vitamin K2.

Total mengde vitamin K2 (MK-7, MK-8, MK-9, MK-9 4H og MK-10) i meieriproduktene ble målt og innholdet ble vurdert i forhold til anbefaling fra European Food Safety Authority (EFSA Panel on Dietetic Products, 2009) og referanseverdi for merking (Lovdata, 2014) om 75 µg per dag for voksne mennesker. EFSA har godkjent at produkter med tilstrekkelig høyt innhold av vitamin K (K1, K2) kan merkes med helsepåstand om at vitamin K er viktig for skjelettet. I følge regelverk for merking av produkter, kan drikkeprodukter som inneholder 7,5% av referanseverdi (5,6 µg/100 g) for vitamin K2 merkes med «kilde til» mens drikkeprodukter som inneholder 15% av referanseverdi (11,25 µg/100 g) for vitamin K2 kan merkes med «rik på» vitamin K2. For andre produkter er kravet 15% av referanseverdi (11,25 µg/100g) for å kunne si at produktene er «kilde til» mens dobbelt så mye (22,5 µg/100 g) må til for å kunne si at produktene er «rik på».

I syrnede melkeprodukter med ulik fettprosent, Kulturmilk, kefir, rømme, Creme Fraiche, Kesam og Cottage Cheese var MK-9 dominerende i tillegg til små mengder MK-8. MK-7 ble ikke detektert.

Konsentrasjon av vitamin K2 i syrnet melk (Kulturmilk og Kefir) er over 5,6 µg per 100 g prøve det vil si høyt nok til å kunne deklare med at produkter er «kilder til» vitamin K2. Skummet Kulturmilk (0,5 % fett) inneholdt mest vitamin K2 sammenlignet med Kulturmilk (3,5 % fett) og Lett Kulturmilk (1,2% fett) og lå på grensen til å kunne si at produktet er «rik på» vitamin K2.

Kefir Økologisk inneholdt nok til å deklare med at produktet er «kilde til» vitamin K2 og lå veldig nær grensen for å kunne si at produktet er «rik på» vitamin K2.

Det var ingen sammenheng mellom fettmengde i produkter og total mengde vitamin K2. Resultater ble sammenlignet med resultater fra kommersielle, eksterne laboratorier. Generelt viste resultatene fra eksterne laboratorier store variasjoner, store standardavvik og dårlig repetertbarhet (resultater ikke vist) i motsetning til analyseresultater presentert i resultatdelen. Metoden beskrevet i kapittel 1.1.5 påviser mer vitamin K2 i produktene enn metoder brukt ved eksterne laboratorier og standardavviket mellom prøvene er liten.

For rømmeprodukter og Crème Fraîche, ligger grensen for å deklare vitamin K2 innhold høyere enn for drikkeprodukter. «Spisbare» produkter må inneholde minimum 15% av referanseverdien dvs. 11,25 µg/100 g prøve for å kunne deklare med at produktet er «kilde til» vitamin K2 og dobbelt så mye for å kunne si at produkter er «rik på» vitamin K2. Ingen produkter i denne gruppen inneholdt nok til å kunne si at produktet er «rik på». Det er kun to produkter som skiller seg ut, Rømmekolle (10% fett) og Lett Rømme (18% fett). Disse produktene inneholdt nok vitamin K2 for å kunne deklare med at produktene er «kilder til». De andre produktene lå under grensen på 11,25 µg/100 g vare. Fettinnhold i produktene varierte fra 35% i Crème Fraîche og Seterrømme til 10% i Crème Fraîche Lett, Lettrømme og Rømmekolle. Resultater viser at Crème Fraîche (35% fett) og Seterrømme (35% fett) inneholdt minst vitamin K2, mens Lettrømme (18% fett) og Rømmekolle (10% fett) inneholdt mest vitamin K2. Det ble ikke registrert noen store forskjeller mellom produkter med høyere fettinnhold og tilsvarende produkter med lavere fettinnhold. Mengde fett i produkter hadde ingen betydning for total mengde vitamin K2 ekstrahert.

For Kesam og Cottage Cheese er kravet for innholdet av vitamin K2 11,25 µg per 100 g for å kunne si at produkter er «kilde til» og 22,5 µg per 100 g for å kunne deklare med at produktet er «rik på» vitamin K2. Alle varianter av Kesam og Cottage Cheese inneholdt nok vitamin K2 til å kunne deklare med at produktene er gode «kilder til» vitamin K2. Innholdet av vitamin K2 i Kesam lå i nærheten av grenseverdien for å kunne deklare med at produktet er «rik på». Innholdet av vitamin K2 i Cottage Cheese var høyt og lå godt over grensen på 22,5 µg per 100 g (ca. 38 µg/100 g). Cottage Cheese tilfredsstiller kravet til vitamin K2-innhold og kan merkes med påstand om at produktet er «rik på» vitamin K2. Det ble ikke registrert store forskjeller mellom Kesam med lavere fettinnhold og Kesam Original. Fettinnhold så derfor ikke ut til å påvirke produksjon av mengde vitamin K2 i Kesam.

Kesam og Cottage Cheese skiller seg ut med høyt innhold av vitamin K2 sammenlignet med andre «ferske» fermenterte meieriprodukter. Årsaken til at disse ferskostene inneholder mye vitamin K2 er ikke kartlagt. En forklaring kan imidlertid være at disse produktene er oppkonsentrert ved hjelp av filtrering (Kesam) eller ved ysting (Cottage Cheese). Oppkonsentrering av ostemasse gir høyere tørrstoff og økt antall bakterieceller i produktene. Da vitamin K2 er bundet til bakterienes cellemembran, vil et høyere antall bakterier kunne tenkes å gi høyere mengde vitamin K2.

Vitamin K2 innholdet i Kesam og Cottage Cheese kan sammenlignes med rapporterte verdier i litteraturen. Manoury et al. (2013) analyserte innholdet av vitamin K2 i 62 fermenterte produkter, blant dem lignende produkter tilsatt mesofil kultur. Innholdet av vitamin K2 i Kesam og Cottage Cheese påvist i denne oppgaven var mye høyere sammenlignet med lignende produkter i studien til Manoury et al. (2013). To produkter skilte seg spesielt ut med høye innhold av vitamin K2 (MK-6, MK-7, MK-8, MK-9 og MK-10) (ca. 52 µg/100 g) og kan sammenlignes med innholdet av vitamin K2 (MK-8 og MK-9) i TINE Cottage Cheese (ca. 38 µg/100 g).

Nivå av vitamin K2 (MK-7, MK-8, MK-9) var høyt i alle blåmuggostene. Total mengde vitamin K2 lå over grensen på 22,5 µg per 100 g vare. Alle blåmuggostene inneholdt nok vitamin K2 til å kunne deklare med at produktene er både «kilde til» (over 11,2 µg/100 g produkt) og «rik på» (over 22,5 µg/100 g) vitamin K2. Selbu Blå har skilt seg spesielt ut blant alle blåmuggostene på grunn av veldig høyt innhold av MK-7 i en av tre ostene, sammenlignet med de andre ostene. Mengde MK-7 har variert fra 3,5 µg/100g til 131,6 µg/100 g produkt. Det er kjent fra litteraturen at *Bacillus subtilis* kan produsere menakinon MK-7 i fermentert soya, kjent som Natto (Tsugawa et al., 2006). Selbu Blå ble analysert for *Bacillus* subsp., men bakterien ble ikke påvist. Videre undersøkelser er nødvendige for å bedre forstå det høye nivået av menakinon MK-7 i blåmuggoster. Høyt innhold av MK-7 i enkelte blåmuggoster har tidligere blitt rapportert av Manoury et al. (2013). Manoury et al. (2013) viste at MK-7 innholdet i blåmuggoster varierte fra 2,5 µg/100 g til ca. 22,3 µg/100 g produkt og i to av fire blåmuggoster ble MK-7 ikke detektert. Det høye nivået skyldes mest sannsynlig samspillet mellom melkesyrebakterier brukt i produksjon og mugg eller gjær som anvendes som modningsflora. Mugg kan ikke produsere vitamin K2 (Bare bakterier kan produsere K2. K1 produseres i planter), men det kan tenkes å ha gunstig effekt på vekstmiljø for melkesyrebakterier slik at de produserer mer.

MK-9 er hovedformen som ble kvantifisert i Norvegiaostene, deretter kommer MK-8. MK-7 ble detektert kun i tre oster. Nivå av vitamin K2 lå over grensen på 11,2 µg per 100 g produkt og var høyt nok til å kunne deklare med at Norvegia ost er «kilde til» vitamin K2. Norvegia Vellagret (lagret minimum 9 måneder) og Norvegia Ekstra Vellagret (lagret minimum 15 måneder) inneholdt noe mer vitamin K2 sammenlignet med Norvegia Original (kortere lagringstid). Lagret Norvegia og Norvegia Økologisk lå over grensen til å deklare med at produktene er «rik på» vitamin K2. Resultatene indikerer at vitamin K-innholdet øker under lagring av osten. Årsaken til disse observasjonene er ukjent og tidligere ikke beskrevet i

litteraturen. Melkesyrebakteriene har ingen elektrontransportkjede, slik som propionsyrebakterier har (Hojo et al., 2007) og kan vokse uten å produsere vitamin K2. Derfor er det vanskelig å si hva som påvirker melkesyrebakteriene til å produsere mer vitamin K2 under lagring. Man kan anta at det kan være andre faktorer under produksjon og lagring som kan spille inn på mengde K2 produsert. Det er begrenset litteratur som rapporterer mengde vitamin K2 og fordelingen på de ulike menakinonene i ost. For harde oster er total mengde vitamin K2 rapportert til å være 47,5 mg/100 g (n=4, MK-4, MK-5, MK-6, MK-7, MK-8, MK-9 og MK-10) fra Koivu-Tikkanen (2000) og 41,5 µg/100g (n=3, MK-4, MK-5, MK-6, MK-7, MK-8, MK-9 og MK-10) fra Qureshi (2013). Manoury et al. (2013) derimot angir nivå av vitamin K2 til 26,6 µg/100g (n=11, MK-6, MK-7, MK-8, MK-9 og MK-10) og dette er mer i samsvar med resultater presentert i denne oppgaven.

I Sveitser og Jarlsbergost ble det målt MK-9 4H, i tillegg til menakinon MK-8 og MK-9 syntetisert av melkesyrebakteriene. Menakinon MK-9 4H lages kun av propionsyrebakterier og finnes kun i oster tilsatt propionsyrekultur. Menakinon MK-9 4H utgjør den største andelen av total mengde vitamin K2 i Sveitser og Jarlsbergost. Standardprøve for MK-9 4H ble ekstrahert fra propionsyrekultur ved hjelp av metoden beskrevet i kapittel 1.1.5. Totalt nivå av vitamin K2 (MK-8, MK-9, MK-9 4H) detektert var høyt i alle ostene, både de originale, med kortere lagringstid (minimum 3 måneder) og lagret ost (med opptil 12 måneder lagring). Selv om produksjonsprosessen er omtrent den samme for Jarlsbergostene var det store forskjeller i innholdet av vitamin K2 fra 48,8 µg per 100 g i Jarlsberg Original skorpefri til 109,9 µg per 100 g ost i Jarlsberg Original med skorpe. Modningstid og forhold under lagring (i skorpe eller skorpefrie oster) er ofte det som skiller ostene fra hverandre. Resultatene i denne oppgaven viste at lagret ost, både Jarlsbergost og Sveitser, inneholdt nesten dobbelt så mye vitamin K2 sammenlignet med original ost med kortere lagringstid. Datagrunnlaget i denne oppgaven er ikke tilstrekkelig til å kunne konkludere med at lagret ost inneholder mer vitamin K2, men resultatene peker i den retning. Det er imidlertid kjent fra litteraturen at propionsyrebakterier vokser under lagring og produserer mer MK-9 4H og dermed mer vitamin K2 totalt sett. MK-9 4H er en viktig faktor i dannelse av propionsyre hos propionsyrebakterier (de Vries et al., 1977). Både Jarlsberg og Sveitser er kjent for høyt innhold av vitamin K2 (Hojo et al., 2007). Koivu-Tikkanen (2000) har rapportert innholdet av vitamin K2 (K1 og MK-4, MK-5, MK-6, MK-7, MK-8, MK-9 og MK-10) i Edamer type ost på 49,4 µg/100 g ost, mens Hojo et al. (2007) har oppgitt konsentrasjon av vitamin K2 (vitamin K1, MK-4 og MK-9 4H) til 44,7 µg/100 g i Emmentaler og 79,6 µg/100 g i norsk Jarlsbergost. Nivå av vitamin K2 (MK-8, MK-

9 og MK-9 4H) varierer fra 48,8 µg per 100 g i Jarlsberg Original til 109,9 µg per 100 g ost i Jarlsberg Original med skorpe. Dette bekrefter at norsk Jarlsberg inneholder mer vitamin K2 enn utenlandske oster som for eksempel sveitsiske Emmentaler osv. (Manoury et al., 2013, Hojo et al., 2007). Jarlsbergost og Sveitser tilfredsstiller krav til merking av produkter med at ostene er «gode kilder til» vitamin K2 og inneholder godt over grensen til å kunne si at ostene er «rik på» vitamin K2.

I gruppen kalt «andre typer hvitoster» inngår Kvitlin, Balsfjord og TINE Ekte Hvit Geitost, Norbo, TINE Gräddost, TINE Norsk Edamer og TINE Edamer Vellagret. I denne gruppen, inneholdt alle oster, unntatt TINE Ekte Hvit Geitost, nok vitamin K2 (over 11,2 µg per 100 g) til å kunne deklare med at produktet er «kilde til» vitamin K2, men for lite til å kunne deklare med at produktene er «rik på» vitamin K2. TINE Edamer-ostene, både den originale og lagret, inneholdt nok til å kunne si at produktet er både «kilde til» vitamin K2 og «rik på» vitamin K2. Sammenlignet med litteraturen (Koivu-Tikkanen, 2000) var innholdet av vitamin K2 (MK-8 og MK-9) i TINE Edamer målt til 29,3 µg/100 g ost og 22,9 µg/100 g målt i TINE Edamer Vellagret. Koivu-Tikkanen (2000) har rapportert 40,5µg/100g i Edam type ost. Det var registrert store variasjoner i mengde vitamin K2, spesielt i ostene produsert med geitemelk. For eksempel TINE Ekte Hvit Geitost inneholdt kun 3,8 µg/100 g vitamin K2 mens i Kvitlin (en av tre produksjoner ble det ikke detektert vitamin K2) innhold total 16,3 µg/100 g.

Hvitmuggostene er tilsatt starterkultur bestående av ulike melkesyrebakterier og mugg som modningsflora. Selv om alle hvitmuggostene var tilsatt melkesyrebakterier var innholdet og mengde vitamin K2 veldig forskjellig. Snøhetta, Fryd Brie og TINE Camembert inneholdt ingen vitamin K2 mens TINE Økologisk Brie inneholdt mye vitamin K2 (48,7 µg per 100 g). Nivået av vitamin K2 i TINE Økologisk Brie var over grensen til å kunne si at produktet er «kilde til» og «rik på» vitamin K2. Disse resultatene kan forklares ved at starterkulturene som benyttes under produksjon av TINE Økologisk Brie og de øvrige hvitmuggostene er forskjellige og har ulike egenskaper. Starterkulturen som benyttes under produksjon av TINE Økologisk Brie inneholder mesofile melkesyrebakterier. Spesielt *Lactococcus* subsp., er kjent for å være en god vitamin K2-produsent (Morishita et al., 1999). Snøhetta, Fryd Brie og TINE Camembert fremstilles med termofile bakterier type *Streptococcus thermophilus* og ulike *Lactobacillus* subsp. Disse bakteriene derimot er kjent fra litteratur til å ikke lage noe vitamin K2 (Morishita et al., 1999).

Kittmodnet ost inneholdt nok vitamin K2 til å si at produktet er «kilde til» og innholdet var på grensen til å si at produktet er «rik på».

I norsk tradisjonost (Gamalost) og Chevre ble det påvist MK-7, MK-8, MK9 og i tillegg MK-10 i Gamalost. MK-7 ble ikke detektert i Chevre Ramsløk Haukeli. Chevre Original Haukeli inneholdt mest vitamin K2 (108,1 µg/100 g) sammenlignet med Chevre Naturell Haukeli (68,6 µg/100 g) og Chevre Ramsløk Haukeli (50,8 µg/100 g). Chevre Original Haukeli skiller seg fra Chevre Naturell Haukeli ved at førstnevnte ost er dekket med hvitmugg. Selv om mugg ikke produserer vitamin K2, kan den kanskje påvirke vekstmiljøet til melkesyrebakteriene.

Nivå av vitamin K2 var høyt i Gamalost. Det ble målt til 123,8 µg/100 g i Gamalost fra Vik og 85,4 µg/100 g i Gamalost fra Vik, smørbar. Gamalost inneholder også trolig MK-10 i tillegg til MK-7, MK-8, MK-9. For identifisering av MK-10 ble det ikke brukt standardprøve men retensjonstid. Det ble antatt at det var MK-10 fordi toppene på kromatogrammet hadde lengre retensjonstid enn toppene for MK-9 4H (Tabell 9) og FLD-responsfaktor var den samme som for andre menakinoner (Tabell 11).

I TINE Pultost ble det ikke påvist MK-10, men total mengde vitamin K2 lå godt over grensen til å kunne deklare at produktet er «kilde til» og «rik på» vitamin K2.

Generelt inneholder alle norske tradisjonsoster som Gamalost, Pultost pluss Chevre mer enn nok vitamin K2 til å kunne deklare med at de er både «god kilde til» og «rik på vitamin K2».

5.3 Om resultater fra fermentering

TINE har ønske om å komme fram til en metode for å øke vitamin K2 innholdet i sine produkter. Vitamin K2-produksjon hos melkesyrebakterier kan påvirkes med ulike miljøfaktorer og tilsetninger (Walther et al., 2013).

Effekt av pH på vekst av en kommersiell kultur i skummetmelk og produksjon og vitamin K2 ble testet. Det ble gjennomført 16 fermenteringsforsøk hvor skummetmelk ble syret med pH-kontroll i fermentor og tre fermenteringsforsøk uten pH-kontroll ved 25°C. pH i melk ble stabilisert med lut eller med natriumkarbonat.

Det ble observert en tydelig effekt av pH i skummetmelk tilsatt lut. Fermentering ved høyere pH-verdier (pH 6,5 og 6,0) ga høyest konsentrasjon av MK-9 og mest bakterieceller. Samme

pH-effekt ble ikke observert i skummetmelk tilsatt natriumkarbonat. Mengde MK-9 var mye lavere over hele pH-området sammenlignet med skummetmelk tilsatt lut. Unntaket var pH 5,0 med høyere konsentrasjon av MK-9 og dobbel så mange bakterieceller i skummetmelk tilsatt natriumkarbonat enn i skummetmelk tilsatt lut. Resultatene viste at natriumkarbonat hadde bedre effekt enn lut ved lav pH. Antall bakterieceller produsert i skummetmelk tilsatt natriumkarbonat er høyere ved lav pH enn i skummetmelk tilsatt lut. Dette stemmer med det som er beskrevet i litteraturen tidligere (Jiang et al., 2010). Jiang et al. (2010) viste at HCO_3^- stimulerer aktiviteten av 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl koenzym A syntase og er viktig for vekst av bakterieceller. Ved høy pH derimot kan det se ut som tilsetning av natriumkarbonat påvirket betingelser og hemmet produksjon av MK-9.

6 Konklusjon

Metoden som ble utviklet for måling av de ulike menakinoner i meieriprodukter er en enklere og mer effektiv metode sammenlignet med metoden til Manoury et al. (2013). Metoden bruker kun syrebehandling av prøver i ekstraksjonstrinnet og ekstraksjonsprosedyren ble forenklet. Prøvemengde ble optimalisert og mengde tilsetningsstoffer ble redusert. Analysetiden ved HPLC ble betydelig forkortet og sensitivitet/oppløsning ble optimalisert. Det ble oppnådd god separasjon av menakinoner, fra MK-7 til MK-10. Metoden påviser mer vitamin K2 i produktene sammenlignet med metoden til Manoury et al. (2013) eller Koivu-Tikkanen (2000). Metoden er en god og nyttig metode for måling av ulike former av vitamin K2 og fordelingen av langkjedete menakinoner i meieriprodukter.

Innhold av total mengde vitamin K2 varierer mellom de ulike produktene og produktgruppene som ble undersøkt. I produktene Snøhetta, Fryd Brie, TINE Camembert ble det ikke påvist vitamin K2. Derimot ble høye innhold av vitamin K2 påvist i ost som Gamalost fra Vik (123,8 μg per 100 g), Jarlsberg med skorpe (109,9 $\mu\text{g}/100$ g) (lagret minimum 3 måneder) og Chevre Original (108,1 $\mu\text{g}/100$ g). MK-9 var hovedformen syntetisert av melkesyrebakterier, deretter kom MK-8. MK-9 4H var den viktigste menakinon i oster hvor propionsyrekultur ble brukt i tillegg til melkesyrebakterier og det var denne som varierte mest i innholdet. De store variasjoner forklares med at det ble brukt ulike starterkultur og ulike betingelser under produksjon og modning. Mange av TINE produkter er gode kilder til vitamin K2.

Denne oppgaven viser at mange eksisterende TINE produkter inneholder mye vitamin K2, spesielt de langkjedete menakinonene: MK-7, MK-8, MK-9 og MK-10. Store variasjoner i mengde vitamin K2 i de ulike ostene viser at ulike bakteriestammer har ulik evne til å produsere vitamin K2. Valg av gode starterkulturer og endring av prosessbetingelser kan øke mengde vitamin K2 i produktene. De innledende forsøkene viste at vekst av starterkultur under kontrollerte forhold, for eksempel under stabil pH, øker mengde bakterieceller og stimulerer produksjon av vitamin K2 ytterligere. Det må mer forskning til for å studere effekten av ulike tilsetninger. Innsikt i hvilke miljøfaktorer og tilsetninger som påvirker produksjon av vitamin K hos bakterier vil gi mulighet for optimalisering av produksjonsprosesser med mål om å øke vitamin K2-innhold i meieriprodukter. Nåværende kunnskap viser at fermenterte meieriprodukter er en viktig kilde til vitamin K2 i kostholdet.

7 Veien videre

Hovedmålet med denne oppgaven, som var å komme fram til en metode for å øke vitamin K2-innholdet i meieriprodukter, ble ikke oppnådd. Imidlertid ble det gjennom forsøkene gjort mange interessante observasjoner og funn. For å skaffe mer informasjon om kulturer og prosessbetingelser foreslås følgende oppfølgingsforsøk:

- Test av flere ulike egne og kommersielle kulturer med hensyn på vitamin K2-produksjon.
- Gjøre fermenteringsforsøk og studere miljøfaktorer og andre tilsetninger på produksjon av vitamin K2 hos bakterier.
- Velge de mest interessante kulturer og prosessbetingelser for videre testing i produkt.
- Produsere i pilotskala produkt med forhøyet innhold av vitamin K2.

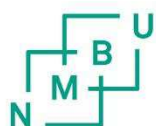
8 Referanser

- ASKIM, M. 2001. Vitamin K i norsk kosthold og beinskjørhet. *Tidsskrift for Den norske legeforening*, 22.
- BERKNER, K. L. & RUNGE, K. W. 2004. The physiology of vitamin K nutrition and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2.
- BEULENS, J. W. J., BOTS, M. L., ATSMAN, F., BARTELINK, M. L. E. L., PROKOP, M., GELEIJNSE, J. M., WITTEMAN, J. C. M. & GROBBEE, D. E. 2009. High dietary menaquinone intake is associated with reduced coronary calcification. *Atherosclerosis*, 203, 489-493.
- BEULENS, J. W. J., VAN DER A, D., GROBBEE, D. E., SLUIJS, I., SPIJKERMAN, A. M. W. & VAN DER SCHOUW, Y. T. 2010. Dietary Phylloquinone and Menaquinones Intakes and Risk of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 33(8), 1699-1705.
- BINKLEY, N. C., KRUEGER, D. C., KAWAHARA, T. N., ENGELKE, J. A., CHAPPELL, R. J. & SUTTIE, J. 2002. A high phylloquinone intake is required to achieve maximal osteocalcin gamma-carboxylation. *American Society for Clinical Nutrition*.
- BROOIJMANS, R., SMIT, B., SANTOS, F., VAN RIEL, J., DE VOS, W. M. & HUGENHOLTZ, J. 2009. Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, 8, 28.
- COLLINS, M. D. & JONES, D. 1981. Distribution of Isoprenoid quinone Structural Types in Bacteria and Their Taxonomic Implications. *Microbiological Reviews*, 45, 316-354.
- DAM, H. 1946. The discovery of vitamin K, its biological function and therapeutical application. *Nobel Lecture*.
- DE VRIES, W., ALEEM, M. I. H., HEMRIKA-WAGNER, A. & STOUTHAMER, A. H. 1977. The Functioning of Cytochrome b in the Electron Transport to Fumarate in *Propionibacterium freudenreichii* and *Propionibacterium pentosaceum*. *Archives of Microbiology*, 112, 271-276.
- DREVON, C. A., HENRIKSEN, H. B., SANDERUD, M., GUNDERSEN, T. E. & BLOMHOFF, R. 2004. Biologiske effekter av vitamin K og forekomst i norsk kosthold. *Tidsskriftet Den norske legeforening*, 12, 124.
- DUNPHY, P. J. & BRODIE, A. F. 1971. The structure and function of quinones in respiratory metabolism. *Meth Enzymol*, 18C, 407-461.
- EFSA PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, N. A. A. N. 2009. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to vitamin K and maintenance of bone (ID 123, 127, 128 and 2879), blood coagulation (ID 124 and 126), and function of the heart and blood vessels (ID 124, 125 and 2880) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006; hentet 10.01.18 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2009.1228/epdf>. *EFSA Journal*, 7(9).
- FERLAND, G. 1998. The Vitamin K-dependent Proteins: An Update. *Nutrition Reviews*, 56, 223-230.
- FOLKEHELSEINSTITUTTET 2016. Fakta om beinskjørhet og brudd (osteoporose og osteoporotiske brudd). Hentet 12.12.2017: <https://www.fhi.no/fp/folkesykdommer/beinskjoerhet/beinskjoerhet-og-brudd---fakta-om-os/#beinskjoerhet-osteoporose>.
- GELEIJNSE, J. M., VERMEER, C., GROBBEE, D. E., SCHURGERS, L. J., KNAPEN, M. H. J., VAN DER MEER, I. M., HOFMAN, A. & WITTEMAN, J. C. M. 2004. Dietary Intake of Menaquinone Is Associated with a reduced Risk of Coronary Heart Disease; The Rotterdam Study. *The American Society for Nutritional Sciences*, 134, 3100-3105.
- GREER, F. R. 2001. Are Breast-Fed Infants Vitamin K Deficient? *Bioactive Components of Human Milk*, 501, 391-395.
- GREIBROKK, T., LUNDANES, E. & RASMUSSEN, K. E. 1998. *Kromatografi, Separasjon og deteksjon*, Universitetsforlaget AS.
- HABU, D., SHIOMI, S., TAMORI, A. & AL., E. 2004. Role of vitamin K2 in the development of hepatocellular carcinoma in women with viral cirrhosis of the liver *JAMA*, 292 (3), 358-361.

- HELSEDIREKTORATET 2014. Nytt liv og trygg barseltid for familien - Nasjonal faglig retningslinje for barselomsorgen. Vitamin K-profylakse. Hentet 12.12.2017: <http://www.helsebiblioteket.no/retningslinjer/barselomsorgen/screening-og-unders%C3%B8kelser/vitamin-k-profylakse>.
- HEY, H. & BRASEN, C. L. 2015. K2-vitamin har betydning ved en række sygdomme. *Ugeskr Læger*, 177, V12140700.
- HOJO, K., WATANABE, R., MORI, T. & TAKETOMO, N. 2007. Quantitative measurement of Tetrahydromenaquinone-9 in Cheese Fermented by Propionibacterium. *Journal of Dairy Science*, 90, 4078-4083.
- HOMMA, K., WAKANA, N., SUZUKI, Y., NUKUI, M., DAIMATSU, T., TANAKA, E., TANAKA, K., KOGA, Y., NAKAJIMA, Y. & NAKAZAWA, H. 2006. Treatment of Natto, a fermented Soyabean Preparation, to Prevent Excessive Plasma Vitamin K Concentrations in Patients Taking Warfarin. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52, 297-301.
- IWAMOTO, J., TAKEDA, T. & ICHIMURA, S. 2000. Effect of combined administration of vitamin D3 and vitamin K2 on bone mineral density of the lumbar spine in postmenopausal women with osteoporosis. *Journal Orthopaedic Science* 5, 546.
- JIANG, M., CHEN, M., GUO, Z.-F. & GUO, Z. 2010. A Bicarbonate Cofactor Modulates 1,4-Dihydroxy-2-naphthoyl-Coenzyme A Synthase in Menaquinone Biosynthesis of Escherichia coli. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 30159-30169.
- KEGG, K. E. O. G. A. G. 2017. Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis - Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363. Hentet 12.12.2017: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?llm00130.
- KOIVU-TIKKANEN, T. 2000. Determination of phylloquinone and menaquinones in animal products with fluorescence detection after postcolumn reduction with metallic zinc. *Journal of Agric Food Chem*, 48, 6325-31.
- KOIVU-TIKKANEN, T. 2001. Determination of phylloquinone and menaquinones in foods by HPLC.
- KUROSU, M. & BEGARI, E. 2010. Vitamin K2 in electron transport system; are enzymes involved in vitamin K2 biosynthesis promising drug targets? *Molecules*, 15, 1531-1553.
- LOVDATA 2014. Forskrift om matinformasjon til forbrukerne (matinformasjonsforskriften). Vedlegg XIII Referanseinntak. Del A - Daglig referanseinntak av vitaminer og mineraler (voksne). Hentet 12.12.2017: <https://lovdata.no/dokument/LTI/forskrift/2014-11-28-1497>.
- MANOURY, E., JOURDON, K., BOYAVAL, P. & FOURCASSIÈ, P. 2013. Quantitative measurement of vitamin K2 (menaquinones) in various fermented dairy products using a reliable highperformance liquid chromatography method. *Journal of Dairy Science*, 96, 1335-1346.
- MATPORTALEN 2015. Informasjon om sunn og trygg mat fra offentlige myndigheter. Hvor finner jeg informasjon om innhold av vitamin K i mat? Hentet 12.12.2017: http://www.matportalen.no/kosthold_og_helse/tema/naringsstoffer/hvor_finner_jeg_informasjon_om_innhold_av_vitamin_k_i_mat.
- MATSCHINER, J. & DOISY, E. A. 1966. Bioassay of vitamin K in chicks. *Journal of Nutrition*, 90(1), 97-100.
- MICRONUTRIENTS, I. O. M. U. P. O. 2001. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. Vitamin K. . Washington (DC): National Academies Press (US).
- MORISHITA, T., TAMURA, N., MAKINO, T. & KUDO, S. 1999. Production of Menaquinones by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 82, 1897-1903.
- NAKAGAWA, K., HIROTA, Y., SAWADA, N., YUGE, N., WATANABE, M., UCHINO, Y., OKUDA, N., SHIMOMURA, Y., SUHARA, Y. & OKANO, T. 2010. Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature*, 468, 117.
- NIMPTSCH, K., ROHRMANN, S., KAAKS, R. & LINSEISEN, J. 2010. Dietary vitamin K intake in relation to cancer incidence and mortality: results from the Heidelberg cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Heidelberg). *American Society for Clinical Nutrition*.

- OLSON, R. E., CHAO, J., GRAHAM, D., BATES, M. W. & LEWIS, J. H. 2002. Total body phylloquinone and its turnover in human subjects at two levels of vitamin K intake. *The British Journal of Nutrition*, 87, 543-553.
- ORIMO, H., SHIRAKI, M. & TOMITA, A. 1998. Effects of menatetrenone on the bone and calcium in osteoporosis: a double-blind placebo-controlled study. *Journal Bone Mineral Metabolism*, 16, 106.
- QURESHI, T. M. 2013. Formation of biogenic amines and vitamin K contents in the Norwegian autochthonous cheese Gamalost during ripening. *Dairy Sci & Technol.*, 93, 303-314.
- RDAS, R. S. O. T. T. E. O. T. 1989. *Recommended Dietary Allowances; 7 Fat-Soluble Vitamins, Vitamin K*, Washington, D.C., National Academy Press.
- REIKVAM, Å., MADSEN, S. & LANDMARK, K. 2003. Antitrombotisk profylakse etter hjerteinfarkt-acetylsalisylsyre, warfarin eller begge? *Tidsskrift Den norske legeförening*, 13, 123:1838-40.
- RØDBOTTEN, R., GUNDERSEN, T., VERMEER, C. & KIRKHUS, B. 2014. Vitamin K2 in different bovine muscles and breeds. *Meat science*, 97, 49-53.
- SCHURGERS, L. J., DISSEL, P. E. P., SPRONK, H. M. H., SOUTE, B. A. M., DHORE, C. R., CLEUTJENS, J. P. M. & VERMEER, C. 2001. Role of vitamin K and vitamin K-dependent proteins in vascular calcification. *Zeitschrift für Kardiologie*, 90, 57-63.
- SCHURGERS, L. J., TEUNISSEN, K. J. F., HAMULYÁK, K., KNAPEN, M. H., VIK, H. & C., V. 2007. Vitamin K-containing dietary supplements: comparison of synthetic vitamin K1 and natto-derived menaquinone-7. *Blood*, 109, 3279-3283.
- SCHWALFENBERG, G. K. 2017. Vitamins K1 and K2: The Emerging Group of Vitamins Required for Human health. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2017, 6.
- SHEARER, M. J. 1995. The Lancet - Vitamin K. *ScienceDirect*, 345, 229-234.
- SHEARER, M. J., BACH, A. & KOHLMEIER, M. 1996. Chemistry, nutritional source, tissue distribution and metabolism of vitamin K with special reference to bone health. *The Journal of nutrition, suppl. 1995 AIN Symposium proceedings*, 126.4S.
- SHEARER, M. J. & NEWMAN, P. 2008. Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thromb Haemost*, 100, 530-547.
- SHEARER, M. J. & NEWMAN, P. 2014. Thematic Review Series: fat soluble Vitamins: Vitamin K. Recent trends in the metabolism and cell biology of vitamin K with special reference to vitamin K cycling and MK 4 biosynthesis. *Journal of Lipid Research*, 55(3), 345-362.
- SHIRAKI, M., TSUGAWA, N. & OKANO, T. 2015. Recent advances in vitamin K-dependent Gla-containing proteins and vitamin K nutrition. *Osteoporosis and Sarcopenia*, 1, 22-38.
- THEUWISSEN, E., MAGDELEYNS, E. J., BRAAM, L. A., J., T. K., KNAPEN, M. H., BINNEKAMP, I. A., VAN SUMMEREN, M. J. & VERMEER, C. 2014. Vitamin K status in healthy volunteers. *Food Funct*, 5(2), 229-34.
- THIJSSSEN, H. H. W., DRITTIJ, M. J., VERMEER, C. & SCHOFFELEN, E. 2002. Menaquinone-4 in breast milk is derived from dietary phylloquinone. *British Journal of nutrition*, 87, 219-226.
- TSUGAWA, N., SHIRAKI, M., SUHARA, Y., KAMAO, M., TANAKA, K. & OKANO, T. 2006. Vitamin K status of healthy Japanese women: age-related vitamin K requirement for gamma-carboxylation of osteocalcin. 83, 380-386.
- UNDEN, G. 1988. Differential roles for menaquinone and demethylmenaquinone in anaerobic electron transport of E.coli and their fnr-independent expression. *Archives of Microbiology*, 150, 499-503.
- VAN WINCKEL, M., DE BRUYNE, R., VAN DE VELDE, S. & VAN BIERVLIET, S. 2009. Vitamin K, an update for the paediatrician. *European Journal of Pediatrics*, 168, 127.
- VERMEER, C., SHEARER, M. J., ZITTERMANN, A., BOLTON-SMITH, C., SZULC, P., HODGES, S., WALTER, P., RAMBECK, W., STÖCKLIN, E. & WEBER, P. 2004. Beyond deficiency: Potential benefits of increased intakes of vitamin K for bone and vascular health. *Eur J Nutr*, 43, 325-335.
- VILLA, J. K. D., NOGUEIRA, M. A. D., PIZZIOLLO, V. R. & MARTINO, H. S. D. 2016. Effect of vitamin K in bone metabolism and vascular calcification: a review of mechanisms of action and evidences. *Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.

- WALTHER, B., KARL, J. P., BOOTH, S. L. & BOYAVAL, P. 2013. Menaquinones, Bacteria, and the Food Supply: The Relevance of Dairy and Fermented Food Products to Vitamin K Requirements. *Advances in Nutrition*, 4, 463-473.
- WEBER, P. 2001. Vitamin K and bone health. *Nutrition*, 17, 1024.
- WIKIPEDIA 2017. Wikipedia, The Free Encyklopedia, Vitamin K2. Hentet 12.12.2017: https://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_K2.
- WORCESTER, E. M., SEBASTIAN, J. L., HIATT, J. G., BESHENSKY, A. M. & SADOWSKI, J. A. 1993. The effect of warfarin on urine calcium oxalate crystal growth inhibition and urinary excretion of calcium and naphrocalcin. *Calcified Tissue Internasjonal*, 53, 242-248.



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway