

ŞUBAT 2015

YÜKSEK LİSANS-BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

ANFAL AL KATEEB

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA BOYALARININ BAĞIRSAK
FLORASI ÜZERİNE ETKİLERİ VE *LacZ* GEN
EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANFAL AL KATEEB

ŞUBAT 2015

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA BOYALARININ BAĞIRSAK FLORASI ÜZERİNE
ETKİLERİ VE *LacZ* GEN EKSPRESYONUNUN
ARAŞTIRILMASI

BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANFAL AL KATEEB
ŞUBAT

**Gıda Boyalarının Bağırsak Florası Üzerine Etkileri
Ve *LacZ* Gen Ekspresyonunun Araştırılması**

**Gaziantep Üniversitesi
Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman
Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ**

Anfal AL KATEEB

Şubat 2015

© 2015 [Anfal AL KATEEB]

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

Anfal AL KATEEB

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tezin Adı: Gıda Boyalarının Bağırsak Florası Üzerine Etkileri Ve *LacZ* Gen Ekspresyonunun Araştırması

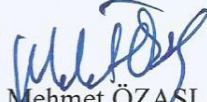
Öğrencinin, Adı, Soyadı: Anfal AL KATEEB

Tez Savunma Tarihi: 17.02.2015

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı


Prof. Doç. Dr. Metin BEDİR
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.


Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımca (tarafımızca) okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

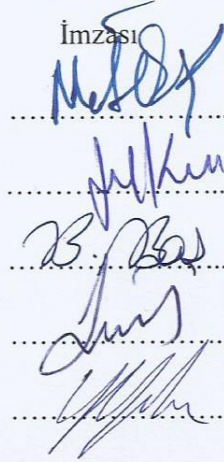
Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

Yrd. Doç. Dr. Berna BAŞ

Yrd. Doç. Dr. Sibel Bayıl OĞUZKAN

Yrd. Doç. Dr. Yusuf YILMAZ

İmzası


ABSTRACT

INVESTIGATION OF EFFECTS OF THE FOOD DYES ON INTESTINAL FLORA AND *LacZ* Gene EXPRESSION

AL KATEEB, Anfal

M. Sc. in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

February 2015

64 pages

Nutrition is one of the most basic needs for the continuation of human life. When compared with almost fifty years ago, we can say that our eating habits changed completely. Today, because of attractive images, without thinking too much on the prepared food that we consume, we are rapidly moving away from natural foods. Food additives are used to impart color, to extend the shelf life of prepared food and to protect from pathogens that cause spoilage. Synthetic food dyes not found in nature according to their chemical structures, but are produced via chemical synthesis. This study aimed to investigate the effect of Brilliant Blue and Dark Green food dyes on the *Escherichia coli* which is part of the intestinal flora. The 3 different concentrations studied of each food dyes. The bacteria treated for 20 days and bacterial counts daily performed. The effects of each dyes on the growth of bacteria and Lac Z expression were determined by real time PCR. Especially after 12 day, bacterial growth in the group of bacteria that treated with Brilliant Blue and Dark Green have been found to decrease compared to control group. Both food dyes were found to not influence significantly on generation of *E. coli* by the expression of the *LacZ* gene.

Key words: Food dyes, intestinal flora, *Escherichia coli* ATCC 10799, Real Time PCR, *LacZ* gene

ÖZET

GIDA BOYALARININ BAĞIRSAK FLORASI ÜZERİNE ETKİLERİ VE *LacZ* GEN EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI

AL KATEEB, Anfal

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

Şubat 2015

64 sayfa

Beslenme, insanın hayatının devamı için en temel ihtiyaçlarından biridir. Elli yıl öncesiyle kıyasladığımızda beslenme alışkanlıklarımızın neredeyse tamamen değiştiğini söyleyebiliriz. Günümüzde çekici görüntüleri nedeniyle, üzerinde çok da fazla düşünmeden tükettiğimiz hazır yiyeceklerle, doğal besinlerden hızla uzaklaşıyoruz. Hazır yiyeceklerin raf ömrünü uzatmak, bozulmaya neden olacak patojenlerden korumak ve renk vermek için gıda katkı maddeleri kullanılmaktadır. Sentetik gıda boyaları kimyasal yapıları itibarıyla doğada bulunmayan ama kimyasal sentez yoluyla üretilen gıda renk maddeleridir. Çalışmamızda Brilliant Blue ve Dark Green gıda boyalarının bağırsak florasının bir parçası olan *Escherichia coli* üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Her gıda boyasının 3 farklı konsantrasyonu çalışılmıştır. 20 gün boyunca muamele edilmiş ve günlük bakteri sayımları yapılarak bakteri gelişimi üzerine etkileri ve *Lac Z* ekspresyonu real time PCR ile araştırılmıştır. Özellikle 12. günden sonra kontrol grubuna kıyasla Brilliant Blue ve Dark Green uygulanan bakteri gruplarında bakteri büyümesinin azaldığı saptanmıştır. Her iki gıda boyasının *E. coli* jenerasyonları *lacZ* gen bölgesinin ekspresyonu üzerine anlamlı bir etki etmediği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Gıda boyaları, bağırsak florası, *Escherichia coli* ATCC 10799, Gerçek Zamanlı, *Lac Z* gen

Çok kıymetli aileme.....

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince tüm bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen ve tezimde büyük emeği olan, aynı zamanda kişilik olarak da bana çok şey katan Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN' a, danışman hocam, sayın Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ 'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca yüksek lisans dönemi boyunca yardımlarını esirgemeyen Yüksek Biyolog arkadaşlarım Ayşe KARADUMAN'a, biyolog Neşe ERDOĞAN'a ve Haki ALTUNOVA'ya çok teşekkür ederim.

Çalışma süresince beni hep destekleyen ve güvenen çok sevdiğim biricik kocam ve tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT.....	v
ÖZET.....	vi
TEŞEKKÜRLER.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiv
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ.....	1
1.1.Gıda Katkı Maddesi.....	1
1.2. Gıda Boyaları.....	3
1.2.1. INS (International Numbering System) ve E Kodu.....	6
1.2.2. Gıda Boya Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması.....	7
1.2.2.1 Gıda Boyalarının Köklerine Göre Sınıflandırılması.....	8
1.2.2.1.1 Doğal Gıda Boyaları.....	8
1.2.2.1.2 Yarı Sentetik Gıda Boyaları.....	9
1.2.2.1.3 Sentetik Gıda Boyaları.....	9
1.2.2.1.3.1 FD&C Boyaları.....	9
1.2.2.1.3.2 FD&C Lake Boyaları.....	13
1.2.2.2 Gıda Boyalarının Toksikolojik Değerlendirmeye Göre Sınıflandırılması.....	15
1.3.Gıda Boyalarının Metabolizması.....	16
1.4.Gıda Boyalarının Toksik Etkileri.....	17

1.5.Gıda Boyalarının Genotoksisitesi.....	17
1.6.Gıda Boyalarının Karsinojenitesi.....	18
1.7.Gıda Boyalarının Nörotoksisitesi.....	19
1.8.Sentetik Gıda Boyalarının Kullanıldığı Gıdalar.....	20
1.9.Bağırsak Mikroflorası.....	26
BÖLÜM 2.....	29
2.KONUyla İLGİLİ YAPILAN DAHA ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	29
BÖLÜM 3.....	34
MATERYAL VE METOD.....	34
3.1. MİKROBİYOLOJİK ÇALIŞMALAR.....	34
3.1.1. KULLANILAN MALZEMELER.....	34
3.1.2. METOD.....	35
3.1.2.1. BAKTERİ SUŞLARININ HAZIRLANMASI.....	35
3.1.2.2. GIDA BOYALARI SOLÜSYONLARININ HAZIRLANMASI.....	35
3.2. MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR.....	38
3.2.1. KULLANILAN MALZEMELER.....	38
3.2.2. METOD.....	39
3.2.2.1 <i>E. coli</i> RNA İZOLASYONU (High Pure PCR RNA Kit).....	39
BÖLÜM 4.....	42
BULGULAR.....	42
BÖLÜM 5.....	46
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	46
KAYNAKLAR.....	49

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1 FD&C' ye göre kabul edilen ADI değerleri	6
Tablo 1.2 Sertifikalı FD&C boyaların sınıflandırılması	13
Tablo 1.3 FD&C Boyalarının çözücülerde gösterdikleri çözünürlükler	14
Tablo 1.4 Boyaların kullanımları sırasında doğan avantaj ve dezavantajlar	15
Tablo 1.5 Sertifikalı boyalar ile lake boyalar arasındaki farklılıklar	16
Tablo 1.6 FDA ve Avrupa Birliği tarafından gıdalarda kullanılmasına izin Verilen bazı sertifikalı boyalar	22
Tablo 1.7 Sentetik gıda boyalarının numaralandırmaları ve bazı yorumlar	23
Tablo 3.1 Gıda Boyaları Solüsyonlarının Hazırlanması	42
Tablo 3.2 Hazırlanan Ortamlardaki Konsantrasyonlar	42
Tablo 3.3 Hazırlanan PCR mix	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1 Katkı maddeleri.....	1
Şekil 1.2 Gıda Boyası.....	4
Şekil 1.3 Doğal Gıda Boyası.....	9
Şekil 1.4 FD&C Red No.2 genel yapısı.....	11
Şekil 1-5 FD&C Green genel yapısı.....	11
Şekil 1-6 FD&C Red No.3 genel yapısı.....	12
Şekil 1-7 FD&C Blue No.2 genel yapısı.....	12
Şekil 1-8 E-132 indigo carmine genel yapısı.....	24
Şekil 1-9 E 132 Tetrazine genel yapısı.....	24
Şekil1-10 Brilliant Blue FCF genel yapısı.....	26
Şekil 1.11 Nöron.....	26
Şekil 1.12: Nükleotit biriminin yapısı.....	30
Şekil 1.13: <i>E.coli</i> 'nin lac operonu.....	31
Şekil 1.14: Laktoz'un β _galaktozidaz tarafından galaktoz ve glukoza Parçalanması.....	32
Şekil 1.15 <i>E.coli</i> 'de katabolit reprosyon.....	32
Şekil 3.1. a.McFarland cihazı, b. Çalkalayıcı İnkübatör, c. Vorteks cihazı.....	40
Şekil 3.2 Bakteri Canlandırılması.....	41
Şekil 3.3 Gıda boyalarının Konsantrasyonları.....	42
Şekil 3.4 Gıda boyaları ve Kontrol Konsantrasyonları.....	43
Şekil 3.5 Dark Green'nin seyreltilmesi.....	43

Şekil 3.6 Brilliant Blue'nin seyreltilmesi.....	44
Şekil 3.7 <i>E. coli</i> bakterisinin PCA katı besiyerine ekilmesi.....	44
Şekil 4.1: <i>E. coli</i> inokülasyonundan Dark Green ile 24 saat sonraki Görünüm.....	49
Şekil 4.2: <i>E. coli</i> inokülasyonundan Brilliant Blue ile 24 saat sonraki görünüm.....	49
Şekil 4.3: <i>E. coli</i> ATCC 10799 suşunun Brillant Blue gıda boyasında inokülasyonundan 24 saat sonraki görünüm.....	50
Şekil 4.4 <i>E. coli</i> ATCC 10799 suşunun Dark Green boyasında inokülasyonundan 24 saat sonraki görünüm.....	51
Şekil 4.5: Dark Green gıda boyasının Real Time PCR sonucu	52
Şekil 4.6: Dark Green gıda boyasının Real Time PCR sonucu	53

KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri.
ADI	Acceptable Daily Intake (Kabul Edilebilir Günlük Alım Miktarı).
CAC	Codex Alimentarius Commission.
DNA	Deoksiribonükleik asit.
E Kodu	Europe standard number.
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
EMB	Eozin Metilen Blue.
EFSA	European Food Safety Authority.
FD&C	Federal Food, Drug, and Cosmetic (Federal Gıda, İlaç ve Kozmetik).
FAO	Food and Agriculture Organization.
FDA	Food Drug Administration (Gıda ve İlaç Dairesi).
GKM	Gıda Katkı Maddeleri.
INS	International Numbering System.
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives.
mg	Miligram.
µl	Mikrolitre.
ml	Mililitre.

MN	Mikronükleus.
NOAEL	Number Observed Adverse Effect Level.
PCA	Plate Count Agar.
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PFA	Prevention of Food Adulteration (act of India).
RNA	Ribonükleik asit.
SOD	Superoxide Dismutase.
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü).

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ

1.1. Gıda Katkı Maddesi

Gıda katkı maddeleri en geniş anlamıyla gıdalara ilave edilen maddelerdir. Bilimsel tanımı ise "Dolaylı veya dolaysız olarak bir yiyeceğin bir bileşeni haline gelmesi veya özelliklerini etkilemesi amacıyla kasıtlı olarak kullanılan maddelerdir". Beslenme; büyüme, gelişme, sağlıklı ve verimli olarak uzun süre yaşamak için gerekli olan enerjiyi ve besin öğelerinin her birini yeterli miktarda sağlayacak olan besinleri, besleyici değerini yitirmeden, sağlığı bozucu duruma getirmeden en ekonomik şekilde almak ve vücutta kullanmaktır. Sağlıklı beslenme biçiminde hedef, organizmanın besin öğeleri gereksinimlerini yeterli ve dengeli bir şekilde karşılamaktır. Bu gereksinim karşılanmadığında yetersiz ve dengesiz beslenme sorunu ve bozuklukları oluşacaktır. Beslenme yetersizliği ve dengesizliği bazı hastalıkların oluşmasında doğrudan, bazılarında ise dolaylı nedenlerdir (Gökmen ve Köksal, 2001). Gıda pazarı gün geçtikçe daha geniş bir özelliğe sahip işlenmiş gıda yönünde hızlı bir değişime uğramaktadır. Bu gıdalar; Batı Dünyası'nda yaşlı insan sayısının artışı, tek ebeveynli aileler ve çalışan anneler gibi yeni tüketicilerin ihtiyaçlarını karşılamak üzere satılmadan ve hazır hale getirilmeden önce işlenmiş olan gıdalardır. Kalite ve fiyatta tüketici taleplerini karşılayan ve iyi lezzete sahip gıdaları görsel olarak çekici hale getirilmesi de gıda endüstrisinin görevidir. Gıda katkı maddesi, gıdanın bozulduğunu maskeleyici ve tüketiciyi aldatıcı olmamalıdır (Yücecan, 1999).



Şekil 1.1: Gıda katkı maddeleri

Gıda katkı maddeleri; en geniş anlamıyla gıdalara ilave edilen maddelerdir. Gıda katkı maddelerinin dünyadaki pazarı 1900'lü yıllarda 10 milyar dolara ulaşmış olup, günümüzde çok daha büyük rakamlarla ifade edilmektedir. Resmi belgelere göre, 1965 yılında A.B.D.'de yaklaşık 300.000 ton gıda katkı maddesi kullanılmıştır. Dünyada beslenmeye ilişkin iki temel sorun bulunmaktadır. Bu sorunlardan birisi gıda güvencesizliğidir. Gıda güvencesi tüm insanların sağlıklı ve aktif yaşamlarını sürdürebilmeleri için, her zaman yeterli, güvenli, besin değeri yüksek gıdalara ulaşabilmeleri olarak tanımlanmakta ve “gıdanın elde edilmesi”, “gıdaya ulaşma” ve “gıdanın kullanımı” kavramlarını içermektedir. Dünyada yeterli gıdaya ulaşamayan 842 milyon kişinin 798 milyonu az gelişmiş ülkelerde bulunmaktadır ve her yıl beş yaş altı 6 milyon çocuğu da içeren milyonlarca kişi açlığa bağlı olarak yaşamını yitirmektedir. Gıdaya ilişkin ikinci temel sorun gıda güvenliğinin sağlanamamasıdır (FAO, 2003).

Gelişen gıda sanayisi ve nüfusun artmasıyla beraber gıdaları büyük hacimde üretmek ve uzun süre dayanıklı kalmasını sağlama ihtiyacı, gıda katkı maddelerinin yaşamımızın birçok alanına girmesine yol açmıştır. Beslenme alışkanlıklarının değişmesi, en başında çalışanların sayısının gün geçtikçe artması ve bunun paralelinde de besin hazırlama için zaman kısıtlamasına gidilmesi, insanların katkı maddeleri içeren hazır gıdalarla beslenmesine neden olmaktadır (Çelik, 2013). Renk maddeleri gıdaların tatlarını değiştirmeden görüntüsünü cazip hale getirirler. Bir gıdaya bakıldığında insanın dikkatini çeken ilk özelliği rengidir. Dolayısıyla gıdaları çekici hale getiren renk maddeleri, tüketicilerin bir gıdayı alırken karar vermesinde önemli bir faktördür (Bozkırlı, 2007).

Besinlere katılacak gıda katkı maddelerinin miktarlarının belirlenmesi besinlere katılacak katkı maddesinin maksimum miktarlarının belirlenmesi için katkı maddesinin ADI (Acceptable Daily Intake); günlük alınabilecek miktarının bilinmesi gereklidir. Katkı maddesinin ADI değeri toksikolojik testlerle saptanır (Gürçan, 1993).

Gıda katkı maddeleri düzenlemeleri ulusal bir kavram olmaktan çıkıp, uluslararası boyut kazanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Gıda Tarım Örgütü'nün (Food and Agriculture Organization-FAO) ortak çalışmaları ile Uluslar Arası Gıda Kodeks

Komisyonu (Codex Alimentarius Comission-CAC) oluşturulmuştur. CAC'nin alt kuruluşu olan Gıda Katkı Maddeleri Ekspert Komitesi; (JECFA- Joint Expert Committee on Food Additives) her yıl gıda katkı maddeleri ile ilgili yaptıkları toplantılarda, tüm ülkelere öneri niteliğinde standartlar hazırlamaktadırlar (Erden ve Çalışkan, 2003). Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğin de yer alan gıda katkı maddesi tanımı şöyledir; Normal koşullarda tek başına tüketilmeyen veya gıda hammaddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan; seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında; gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek amacıyla kullanılmasına izin verilen maddelerdir (Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 1997).

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde 300 civarında gıda katkı maddesinin çeşitli gıdalarda değişen miktarlarda kullanılmasına izin verilmiştir. Şimdiye kadar kullanımına onay verilen gıda katkı maddesi sayısı yaklaşık 2800'dür. Ancak bugün bunların önemli bir bölümü daha uygun alternatifleri bulunduğu için teknik sebeplerle kullanılmamaktadır. Avrupa Birliği'nde kullanımına onay verilen gıda katkısı sayısı 297'dir (Sarıkaya vd., 2010).

Gıda katkı maddeleri ve koruyucu katkı maddeleri modern dünyanın vazgeçilmezleri arasındadır. Bunlar, hazır gıdaları boyama, tatlandırma, besleyici olma veya antimikrobiyal özellik gibi değişik amaçlarla kullanılmaktadır. Günümüzde 20.000'in üzerinde katkı maddesinin olduğu bilinmektedir (Öztürk vd., 2007). Gelişen gıda teknoloji ve tüketici bilinçlenmesi, günümüzde ürün kalitesini iyileştirme gayretlerini de artırmaktadır. Tüketicilerin yaşamları için temel gereksinimleri olan gıdaların, güncel teknolojik gerekler doğrultusunda üretilmesi, sağlıklı beslenmenin sağlanması yolunda önemli bir hizmettir. Gıda güvenliğinin ve kalite güvencesinin sağlanması çabaları da tüketici ve toplum sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır (Meggos, 1995 ve Venil vd., 2013).

1.2. Gıda Boyaları

Teknik olarak renk katkı maddesi bir gıdaya, ilaca, kozmetik ürünlere veya insan vücuduna uygulandığı veya ilave edildiği zaman renk açığa veren boya, pigment veya maddelere denir. Gıda boyalarının kullanımı M.Ö 3500 yıllarında eski Mısır'a kadar dayandığı; M.Ö. 3000 yıllarında ise et ürünlerini saklamada tuzdan yararlanıldığı, M.Ö. 900 yıllarında hem tuz, hem de odun tütsüsünün gıda saklama yöntemleri olarak kullanıldığı görülmektedir. Ortaçağda tuz ve odun tütsüsünün yanı sıra, etlere nitrat konarak hem botilizm önlenmeye çalışılmış, hem de etin renginin daha sağlıklı görüldüğü fark edilmiştir (Downham ve Collins, 2000, Altuğ, 2001 ve Basım, 2004). 1500 yıllarında ise Hindistan ve Çin'de deriler baharat ve sebze özleri ile boyanmıştır. 18. yy. da tereyağı safranla boyanmış, 19. yy. da bazı boyaların kullanılması ticaret hayatına girmiştir. İlk sentetik boya Sir William Henry Perkins tarafından siyah anilinden 1856 yılında elde edilmiştir. Gıda boyaları; işleme ve depolama sırasında kaybolan doğal rengi yeniden kazandırmak, zayıf olan rengi kuvvetlendirmek, gerçekte renksiz olan besine renk vermek, düşük kaliteyi gizleyerek tüketici beğenisi kazanmak amacıyla katılırlar (Gökmen ve Köksal, 2001).

1857'de yiyeceklere katılan karışımlarla ilgili araştırmalarda tatlıların kurşun kromat, civa sülfat, kurşun oksit, bakır arsenitle, şekerlemelerin ise elbise boyaları ile boyandığı bulunmuştur. Gıdaların tehlikeli mineral özleri ile boyanması sonucundaki olumsuz izlenimlerden sonra gıda boyalarının kömür katranından elde edilmesi durdurulmuştur (Bozkırlı, 2007).



Şekil 2.2: Gıda Boyası

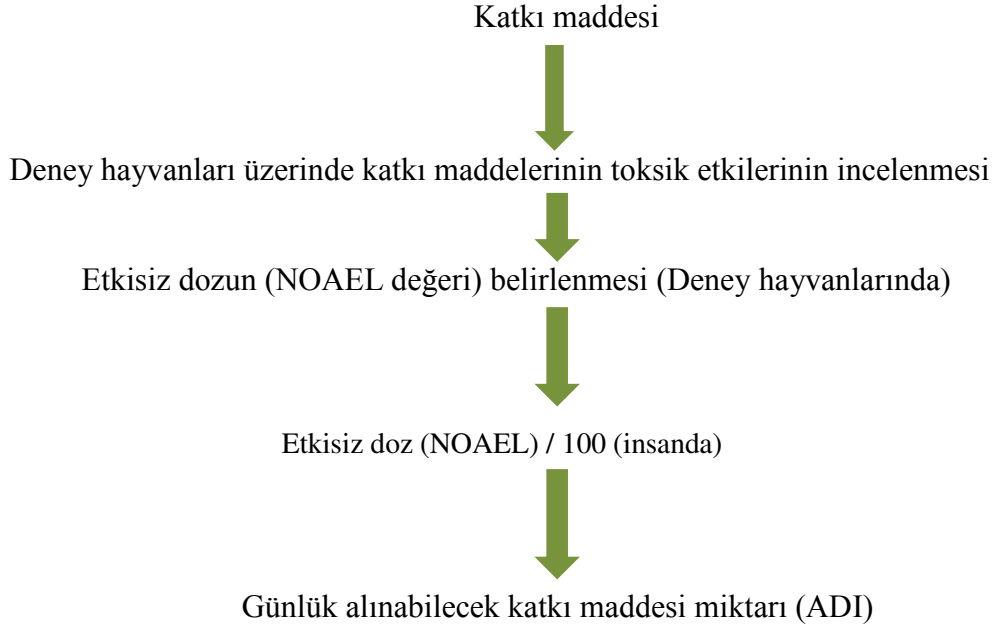
Genel bir tanımla, gıda boyaları gerek sentezle gerek bitkisel, hayvansal veya mineral kaynaklardan ekstraksiyon veya izolasyonla elde olunan, ve her hangi bir gıdaya katıldığında, bizzat kendi mevcudiyeti ile veya gıdanın bileşimindeki diğer

bazı ögelerle reaksiyona girerek ona renk veren kimyasal maddelerdir. Bu tanımdan da anlaşılacağı üzere, boya maddeleri gerek elde olundukları kaynaklar ve kimyasal yapıları, gerek ürüne sağladıkları renkler açısından çok geniş farklılıklar arz ederler. En basit olarak, ürüne sağladıkları renkler açısından tasnif edildiklerinde, boyalar şu şekilde gruplandırılabilirler;

1. Kırmızı Boyalar; Amarant, Eritrosin, Ponceau 4R, Allura Red, kantaksantin, Karmoisin.
2. Turuncu Boyalar; β -Karotin, β -apo-8-karotenal, Annatto, Paprika, Sunset yellow.
3. Sarı Boyalar; Riboflavin, Curcumin, Tartrazin, Safranin, Lutien, Turmerik.
4. Yeşil Boyalar; Klorofil (bakırkompleksi ve Sodyum- Potasyum tuzları), Patent green, Brilliant green.
5. Mavi Boyalar; Brilliant Blue, Indigo karmen, Patent Blue.
6. Menekşe Rengi Boyalar; Antosiyaninler.
7. Kahve Rengi Boyalar; Karamel, Brown FK, Brown HT.
8. Siyah Boyalar; Brilliant Black, Bitkisel karbon.
9. Beyaz Boya; Titandioksit, Talk, Kalsiyum Karbonat (Karaali ve Özçelik, 1993 ve Burrows, 2009).

NOAEL (Number Observed Adverse Effect Level) (Deney Hayvanlarında gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen doz) dozu ile deney hayvanının vücut ağırlığının kilogramı başına mg olarak saptanmış bir dozdur ve insandaki etkileri bilinmemektedir. Deney insanlar üzerinde de etik nedenlerle yapılamayacağından, güvenlik faktörü kullanılır. Güvenlik faktörü genellikle 100'dür. Yani deney hayvanında hiçbir etki göstermeyen dozun 1/100'ü insan için kabul edilir. (ADI = NOAEL / 100). Böylece günlük alınabilecek miktar (ADI) insanın vücut ağırlığının kilogramı başına mg olarak belirlenir. Günlük maksimum alım = ADI x Vücut ağırlığı şeklinde saptanır (Gürcan, 1993 ve Renwiek, 1995).

$$\text{Günlük Maksimum Alım} = \text{ADI} \times \text{Vücut Ağırlığı (kg)}$$



ADI değeri sadece ve sadece JECFA (Joint. Expert Committee on Food Additives) tarafından tespit edilmekle beraber bu değer değişmez değildir. Gıda katkı maddeleri üzerinde yapılan çalışmalar süreklilik taşır ve yeni bulgular çerçevesinde sürekli değerlendirilir (Yurttagül ve Ayaz, 2008). FD&C' ye göre kabul edilen ADI değerleri her gıda boyasına göre aşağıda verilmiştir (Renwiek, 1995).

Tablo 1.1: FD &C' ye göre kabul edilen gıda boyasının ADI değerleri

Boyalar	Maksimum miktarı	Günlük Maksimum Alım
Sunset yellow	0-2,5 mg/kg	Vücut ağırlıkça/gün
Carmoisine	0-1,25 mg/kg	Vücut ağırlıkça/gün
Kinolin sarısı	0-10 mg/kg	Vücut ağırlıkça/gün
İndigo carmine	0-5 mg/kg	Vücut ağırlıkça/gün
Tartazine	0-7.5 mg/kg	Vücut ağırlıkça/gün
Brilliant 4RC	0-4 mg/kg	Vücut ağırlıkça/gün
Eritrosin	0-2,5 mg/kg	Vücut ağırlıkça/gün
Amarant	0-0,75 mg/kg	Vücut ağırlıkça/gün
Patent blue	0-5 mg/kg	Vücut ağırlıkça/gün

1.2.1 INS (International Numbering System) ve E Kodu

Her gıda katkı maddelerinin uluslararası kabul görmüş bir numarası vardır. Örneğin 102: Tartrazin gibi Avrupa Ekonomik Topluluğu'nda kullanımına izin verilen katkı maddelerine "European" kelimesinin baş harfi olan E kodu verilmiştir. E621: MSG, E102: Tartrazin gibi. Aroma maddelerine E kodu ve numara verilmemiştir. Çünkü bu grup çok geniştir. E100–200 arasındaki numaralandırmada gıda katkı maddelerinden gıda boyaları bulunmaktadır (Thomas, 1988).

"E" numara sistemi ile gıda katkı maddelerinin temel işlevlerine göre sınıflandırılması ise şu şekildedir:

- Renklendiriciler (E100 – 180 arası).
- Koruyucular (E200 – 297 arası).
- Antioksidanlar (E 300 – 321 arası).
- Emülsifiyer ve stabilizatörler (E 322 – 500 arası).
- Asit baz sağlayıcılar (E 500 – 578 arası).
- Tatlandırıcılar, koku verenler (E 620 – 637 arası).
- Geniş amaçlılar (E 900 – 927 arası) (Erden ve Çalışkan, 2009).

Gıda mevzuatında; hangi katkı maddesinin hangi gıdaya, ne amaçla ve ne kadar katılacağı belirlenmiştir. Bir katkı maddesinin belirlenen gıda maddesi dışında, başka bir gıdaya katılması veya belirlenen miktardan fazla katılması suçtur (Kotsonis vd., 2001). Ancak sentetik gıda boyalarının yasalara uygun sınırlamalar içinde kullanılmaması toksik etkilerinin ortaya çıkmasına ve halk sağlığını etkileyebilecek risklerin doğmasına yol açabilmektedir (Yentür vd., 1996). Gıda katkı maddelerinin tüketimi arttıkça, bazı rahatsızlıklarla olan bağlantılara yönelik bulgular da ortaya çıkmıştır. Bunların içinde en sıkça görülenleri egzama, astım, baş ağrısı, alerjik kaşıntılar, gastrik rahatsızlıklar, ishal, özellikle çocuklarda hiper aktiflik ve aşırı duyarlılık (hyper sensitivity) vb.'dir (Briggs, 1997).

Gıda katkı maddelerine bağlı alerjik reaksiyonlar azımsanmayacak kadar siktir (Öztürk vd., 2007). Gıda boyaları, gıdaya daha çekici ve lezzetli bir görünüş kazandırmak, üretim aşlamalarında kayba uğrayan rengi telafi etmek, çocuklar gibi

belli tüketici gruplarının dikkatini çekmek amacıyla kullanılır (Meggos, 1995; Kirschbau vd., 2003 ve Sivavd, 2011). Doğal ve sentetik boyaların gıdalarda kullanılması tartışılan bir konudur. Bu boyaların kullanımında tüketicilerin talepleri de önemlidir (Malik vd., 2012).

1.2.2.Gıda Boya Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması

Gıda maddelerine katılan boyaların, sistematik olarak sınıflandırılması birçok bakımdan faydalı görülmüştür. Böylece sınıflandırmada yer alan bir boya maddesinin herkes tarafından aynı şekilde anlaşılması imkân dâhiline girmiş olacaktır. Bazı literatürler de ve bazı kuruluşların yazılarında boyaların belirli sistem altında sınıflandırıldığı görülmektedir. Ancak bu sınıflandırma birbirinden farklı olabilmektedir.

Bunların içinden FAO ve WHO'nun sınıflandırılması en yaygın olanıdır.

Codex'te FAO'nun sınıflandırılması esas alınmıştır (Bayaslı, 1999).

- Boyaların köklerine göre sınıflandırılması.
- Boyaların toksikolojik değerlendirmelerine göre sınıflandırılması.
- Kimyasal sınıflandırma.

1.2.2.1.Gıda Boyalarının Köklerine Göre Sınıflandırılması

1.2.2.1.1.Doğal gıda boyaları

Doğal gıda boyaları bitkisel, hayvansal ve mineral kaynaklardan ekstraksiyon ve izolasyon işlemleriyle elde edilen ve herhangi bir gıda ürününe katıldığında, bizzat kendi varlığıyla veya bu gıda ürününün bileşimindeki diğer bazı öğelerle reaksiyona girerek ona renk veren kimyasal veya kimyasal işlemlerden geçmiş boyar maddelerdir (Rizvivid, 1986).

Bu renklendiriciler sertifikasız olmalarına rağmen, saflıklarının özelliklerle uyum içinde olduğu ve düzenlemeler doğrultusunda kullanıldığının gösterilmesi için FDA (Food Drug Administration) (Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından izlenmektedir. Bazı boyalar vardır ve bunlara da Doğal Özdeşli Boyalar denilmektedir. Beta-karoten,

Beta-apo-8-karotenol ve canthaxantin bu gruptadır. FDA bunlardan beta karotenin herhangi bir düzeyde gıda maddelerine katılmasına izin vermekte, diğerleri için maksimum limitleri belirlemektedir. Antosiyaninler pH 3, 5'in altında maviden kırmızıya doğru değişen tonlarda en yoğun renklerini gösterirler. Bu nedenle sadece asidik gıdalara katılması uygundur. Betalinler pH, ışık ve ısıya duyarlıdır. PH 4-5'te en sabit durumdadırlar ve pancar tadına sahiptirler (Yaman, 1996).



Şekil 1.3: Gıda Boyası

1.2.2.1.2. Yarı Sentetik gıda boyaları

Doğal kaynaklardan elde edilen maddelere uygulanan çeşitli proseslerle üretilenlerdir. Örneğin klorofilin bakır kompleksi veya sodyum, potasyum tuzları ile şekerin yaklaşık 150 °C de, NaOH, NH₄OH v.b. katalistlerle yakılmasından elde olunan karamel bu tasnife girmektedirler. Bunlardan karamelin Türkiye'de endüstriyel ölçekte üretildiği, ancak diğerlerinin dışalım yoluyla sağlandığı bilinmektedir (Selemoğlu ve Yıldız, 1983).

1.2.2.1.3. Sentetik gıda boyaları

Gıda işletmelerinde sentetik gıda boyalarının kullanılması birçok faktörlere de dikkat etmeyi gerektirmektedir. Şekerleme ürünlerinde ve fırında yüksek ısıda pişen yiyeceklerde bazı problemler çıkabilmektedir. İngiltere et, balık, kümes hayvanları, meyve ve sebzeler, çay, kahve, şarap, süt, bal gibi çiğ veya işlemden geçirilmemiş yiyeceklerle herhangi bir renk eklenmesini yasaklamıştır (Furia, 1975) .

Sentetik gıda boyaları doğada bulunmayan renklendiricilerdir ve kimyasal sentez yolu ile üretilirler. Örneğin; gün batımı sarısı, karmosin ve tartrazin gibi boya maddelerinin hepsi sertifikalıdır. İki grupta incelenirler.

- FD&C Boyalar
- FD&C Lake Boyalar (Oben, 1999).

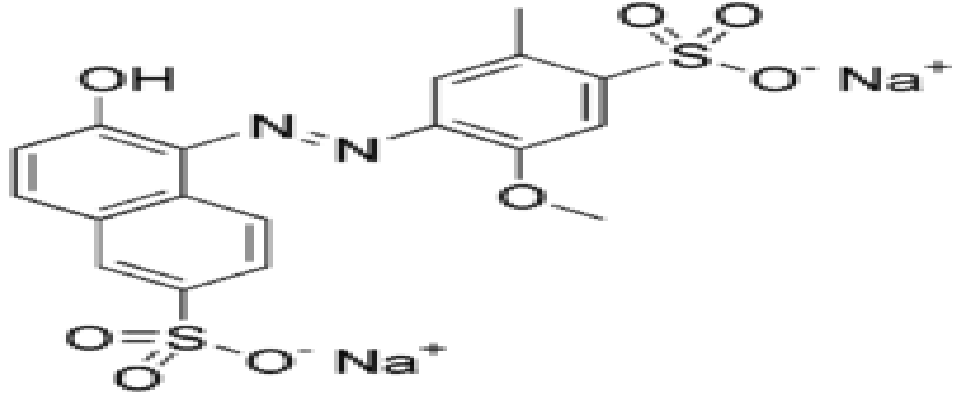
1.2.2.1.3.1. FD&C Boyaları

Bu grup azo, triphenylmethane, fluoresein (xanthrene) ve indigoid olmak üzere dört kimyasal sınıfta incelenmektedir:

1. Azo boyaları; En büyük grup olan azo boyaları azot-azot bağı ($N=N$) içerir. Metalik iyon veya sülfür dioksitle kolayca indirgenirler. Ultraviyole ışınları bu bileşiklerin oksidasyonuna neden olabilir. Azo boyalarının asidikhidroksil grubu içerenlerine asidik azo, bazik amin veya dialkil amin içerenlerine ise, bazik azo boya maddeleri denilmektedir (İzbırak, 1990).

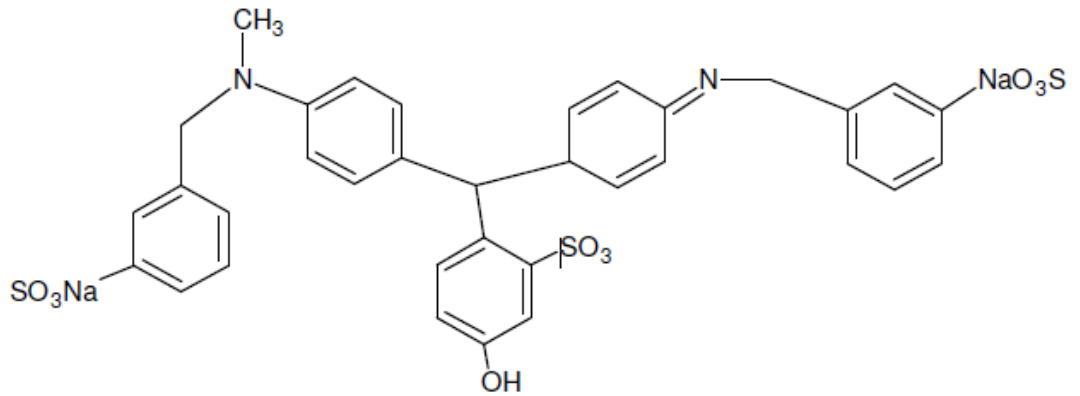
Azo boyalar; azo bileşikleri genel olarak merkezde bulunan nitrojen atomlarıyla bir çift bağ kurarlar. Her nitrojen farklı bir organik gruba bağlıdır ve bu kimyasal yapı elektronların yörüngede yer değiştirebilmesi için idealdir. Bunlar her atomla ilişkili olmayan elektronlardır. Yer değiştirmeye meyilli olan elektronlara sahip azo boyaları ışıqla güçlü etkileşime girer ve o andan itibaren güçlü renklendirici etkisine sahip olabilir.

FD&C RED No.2, FD&C Yellow No.5, FD&C Yellow No.6, FD&C Red No.4 ve Orange B'den oluşur, azo boyalara örnek olarak FD&C Red No.2'nin genel yapısı gösterilmiştir (Karaali ve Özçelik, 1993).



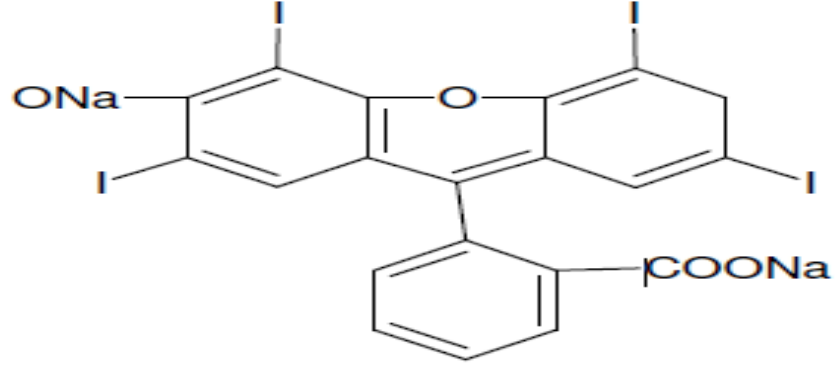
Şekil 1.4: FD&C Red No.2 genel yapısı

- 2. Trifenilmetan Boyaları;** Bu grup boyalar sülfonik asit grubu içerirler ve suda iyi çözünürler. Bu boyalar FD&C Blue No.1, FD&C Green No.3 ve FD&C Violet No.1'den oluşur (Noonan, 1980).



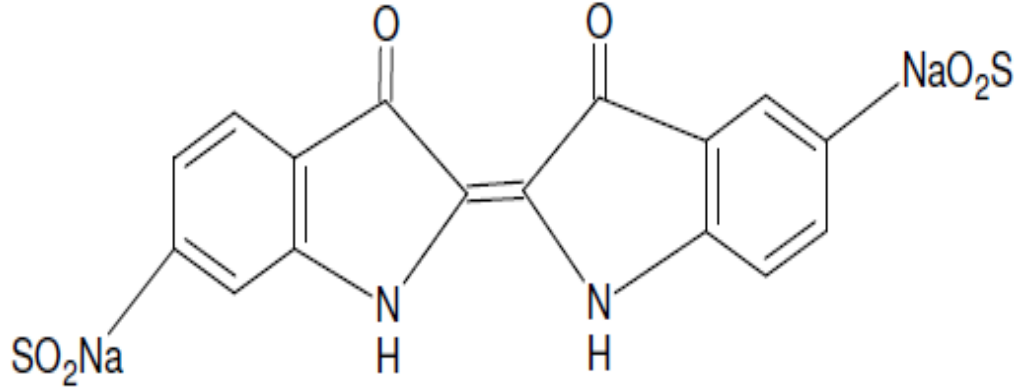
Şekil 1.5: FD & C Green genel yapısı

3. **Fluoressein Tipi (Xanthrene) Boyaları;** Fitalik asit ile resorsinin ısıtılması sonucunda elde edilir. Kırmızı-kahverengi arasında değişen renkler oluştururlar (Noonan, 1980).



Şekil 1.6: FD&C Red No.3 genel yapısı.

4. **Sülfolanmış İndigoid Boyaları;** Temelde indigodan türeyen bileşiklerdir. İndigo doğal boyama maddesidir ve bazı bitkilerde glikozit olarak bulunmaktadır. Bu boyalar ışığa, yıkamaya, baz ve asitlere karşı dayanıklı olup, mavi renkli boyama maddelerinin en önemli grubunu oluşturur (Noonan, 1980).



Şekil 1.7: FD&C Blue No.2 genel yapısı.

FD&C boyaların sınıflandırılması ve yapıları Tablo1.2.'de gösterilmiştir (Furia, 1975).

Tablo1.2: Sertifikalı FD&C boyaların sınıflandırılması

Gruplar	FD&C Food Drug and Cosmetic
Azo Boyaları	FD&C Red No.2, FD&C Yellow No.5, FD&C Yellow No.6 FD&C Red No.4 , FD&C Red No.40 , Orange B.
Trifenilmetan Boyalar	FD&C Blue No.1, FD&C Green No.3, FD&C Violet No.1
Floressein Tipi Boyalar	FD&C Red No.3
Sülfolanmış İndigo Boyalar	FD&C Blue No.2

FD &C boyaları suda çözündükleri halde organik çözücülerde zor çözünürler. Suda çözünürlükleri çok yüksek olduğu için gıda sanayinde kullanımları çok kolaydır ve kullanımında da sorun çıkarmamaktadır. Bu boyalardan sadece FD&C Blue No.2 (indigotin) ayrıcalıklı bir boyadır. Triphenylmethane, indigo ve fluoresein boyaları kimyasal reaksiyonlara daha dirençlidir. FD&C Blue No.2 ve FD&C Red No.3 ultraviyole ışık ile kolayca okside edilir ve rengi çabuk kaybolur. FD&C boyalarının minimum %85 saf boya içermesi gerekir, genellikle %90-93 saf boya içerirler (Yaman, 1996).

Gıda endüstrisinde kullanılan FD&C boyalarının çözünürlüğü ile ilgili değerler Tablo1.3'de gösterilmiştir. Bu bileşikler genellikle değişik formlarda bulunurlar. Örneğin toz, granül, sıvı, sulandırılmış, macunsu gibi. Bu nedenle kullanılacak olan boya katkı maddesinin bulunduğu durum kullanılma hacim ve miktarını etkileyeceğinden, kullanımlarında boyanın formu dikkat edilmesi gereken önemli bir noktadır (Furia, 1980).

Tablo1.3: FD&C Boyalarının çözücülerde gösterdikleri çözünürlükler (Furia, 1980).

Boyalar	Su (21°C)	Gliserin	Propilen Glikol	Alkol
Red 2	134.82	161.04	11.24	Hafif
Red 3	119.84	230.32	217.21	18.73
Red 4	71.15	39.32	11.24	Hafif
Yellow 5	131.08	209.72	89.88	Hafif
Yellow 6	172.27	108.61	18.73	Hafif
Blue 1	187.25	280.88	396.97	14.18
Blue 2	11.24	3.75	Eser	Hafif
Green 3	172.27	108.61	108.61	3.75
Red 40	209.72	29.96	14.98	Hafif
Violet 1	187.25	205.98	138.57	0.94

1.2.2.1.3.2. FD&C Lake Boyaları

Bu boyalar 1959 yılında sertifikalı gıda boyaları olarak kabul edilmiştir. FD&C Lakeler FD&C boyalarına karşılık gelen alüminyum tuzlarıdır. Alüminyum hidratin hazırlama yöntemi ve boyanın emilişi boyama gücünü, tonunu, partikül büyüklüğünü ve dağılımı belirler. Lakeler %1-45 saf boya içeriği ile hazırlanabilir. Ancak bu oran genellikle %10-40'tır. Lakelerin boyama güçleri boya içeriği ile orantılı değildir. Boyalardan daha iyi ışık, kimyasal yapı ile termal stabiliteye sahiptir ve boyalardan daha pahalıdır (Furia, 1975).

Daha çok yağlı ve FD&C boyaları için uygun olmayan düşük nemli ürünler için uygundur. Şeffaflık açısından da boyalardan daha üstündür. FD&C No.40 lakesi hariç bütün lakeler FDA tarafından geçici olarak belirlenmiştir (Yaman, 1996). Bu boya maddelerinin gıda endüstrisinde kullanımları sırasında doğan avantaj ve dezavantajları Tablo1.4'de gösterilmiştir.

Tablo1.4: Boyaların kullanımları sırasında doğan avantaj ve dezavantajlar (Furia, 1980).

Boyanın Formu	Saf Boya %	Avantaj	Dezavantaj
Toz boyalar	88-93	Kuru karışımlar için elverişli	Tozlu
Taneli boyaları	88-93	Tozsuz	Çözünmesi yavaş
Kuru-yaş karışımı boyalar	90	Kuru karışımında yayılmaz	Yok
Sulandırılmış boyalar	1-6	İşlemede kolaylık sağlar	Pahalı
Kırıklı karışım boyalar	22-85	Hassas tartımı yapılabilir	Pahalı
Sulandırılmamış boyalar	1-8	Yağlı ürünlerde kullanılır	Çok pahalı
Macun boyalar	4-10	Nem içerikli ürünlerde	Pahalı

Yapıları nedeniyle Lake Boyalar, susuz ve su kullanımı mümkün olmayan boyamalarda kullanıma uygundur. Yağ orijinli gıdaların boyanmasında genellikle FD&C lake yani pigment boyaları kullanılmaktadır. Lake Boyaları pH 3.5-9.5 arasında sabit bir yapıya sahiptirler (Saldamlı, 1985).

FD&C boyaları ve lakeler gıdalara renk katkı maddesi olarak katılmakla birlikte bu ikitip arasında fiziksel farklılıklar vardır. Bu farklılıklar tablo 1.5.'te gösterilmiştir.

Tablo1.5: Sertifikalı boyalar ile lake boyalar arasındaki farklılıklar (Furia 1975).

Özellikler	Lake boyalar	Boyalar
Çözünürlük	Çözücülerin hiç birinde çözünmez	Suda, propilen glikol, gliserinde çözünür.
Renk verme şekli	Dispersiyon yolu ile	Çözünerek
Saf boya miktarı	% 10-40 dolaylarında	% 90-93
Kullanılma oranı	% 0.1-0.3	% 0.01-0.03
Partikül büyüklüğü	Ortalama 5 mikron	12-200 mesh
Işığa dayanıklılık	Daha iyi	İyi
Isıya dayanıklılık	Daha iyi	İyi
Renk verme gücü	Saf boya miktarı ile orantılı olmaksızın	Doğrudan saf boya miktarı ile ilişkili olarak
Renk tonu	Saf boya miktarına göre değişken	Sabit

1.2.2.2. Gıda Boyalarının Toksikolojik Değerlendirmeye Göre Sınıflandırılması

Boya katkı maddelerinin sağlıkla ilişkisi ve özellikle toksikolojik özellikleri FAO ve WHO laboratuvarlarında incelenmektedir. Buna göre incelemelerin sona erip ermediği esasına dayanarak toksikolojik bir sınıflandırma yapmak mümkündür (Gherorghiev, 1987).

- A Sınıfı; Halen gıdalarda kullanılmasına izin verilen boya maddeleri bu sınıf altında toplanmıştır. Bu boya maddelerinin günlük alınabilecek en yüksek dozları saptanmıştır. Ancak bu gruptaki boyaların üreme ve fetüs üzerine yapmış olduğu etkiler henüz tam manası ile açıklığa kavuşmamıştır. Sınıftaki maddeler hakkında, derinlemesine araştırma yapılmamış olduğundan, ayrı bir sınıf altında toplanmıştır.

- B Sınıfı; Bu sınıftaki maddeler hakkında, A sınıfındaki boyalar kadar derinlemesine araştırma yapılmamış olduğundan, ayrı bir sınıf altında toplanmıştır.
- CI Sınıfı; Bu sınıf boyalar için elde olunan değerler, henüz onların kullanılmasınayeterli değildir ve uzun süreli toksikolojik araştırmaları gerekmektedir.
- CII Sınıfı; Bu sınıf yapılan uzun süreli testlere göre tümör teşkili yapabilen ve dolayısıyla vücutta hasara sebep olan boyalar bu sınıfa dahil edilmiştir. Bu boyalar hakkında bilgiler yetersiz olup, henüz uzun süreli toksikolojik denemeleri yapılamamıştır.
- D Sınıfı; Herhangi bir toksikolojik etkisi bulunup bulunmadığına ait elde edilen bilgileri güvenilir olmayan boya maddeleri bu sınıfa alınmıştır.
- ESınıfı; Tehlikeli etkileri görülen ve gıda maddelerine katılmasına müsaade edilmeyen boya maddeleri bu sınıfa alınmıştır (Gherorghiev, 1987).

1.3. Gıda Boyalarının Metabolizması

Vücuda alınan boya maddesi bağırsakta, asit, sindirim enzimleri ve bağırsak florasının etkisi altında kalmaktadır. Azo maddelerinin türevleri polar ve nonpolar olan aromatic bileşiklerdir (Aksoy, 1984). Bir azo boyası, bağlayıcı bileşen ve diazo bileşeni olarak iki tane organik bileşikten oluşmaktadır. Bu bileşenler değiştirilebildiği için, çok sayıda boya çeşidi elde edilir. -N=N- azo grubu yapısının bir parçasıdır. Azo bağının çevresinde bulunan aromatik yan gruplar, boyanın daha kararlı ve stabil olmasını sağlarlar (Öncül, 2009). Azo molekülünün en kararsız bölümünü oluşturan azo bağları bölünebilir. Bunun sonucunda boya molekülü iki parçaya ayrılır. Bu reaksiyon azo-reduktaz enzimi tarafından gerçekleştirilir. Azo-reduktaz enzimi, çeşitli mikroorganizmalarda (bağırsak bakterileri gibi) ve memelilerde bulunur. Memelilerdeki azo-reduktaz enzimi; karaciğer, akciğer, böbrek, kalp, beyin, dalak ve kas hücrelerinde bulunur. Özellikle karaciğer ve böbrekteki azo-reduktaz enzimi, yüksek enzimatik aktiviteye sahiptir (Öncül, 2009). Parenteral verildiğinde indirgenmeden safra ve idrarda görülmesine karşın, ağızdan verildiğinde amin ürünleri olarak görünmekte, absorbe edilmekte, metabolize olmakta, aynı şekilde atılmaktadır (Chung, 1992).

Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda, boyaların sindirim sistemi, karaciğer ve kanda metabolik değişikliğe uğradığı gözlenmiştir. Bağırsağa alınan boya maddeleri sindirim sistemi enzimleri ve bağırsak florasının etkisi altında kalırlar. Suda çözünen boyaların azo bağlarının redüktif bölünmesi ile aminler ortaya çıkmakta absorbe edilmekte, metabolize olmakta ve aynı şekilde atılmaktadır. Bu yolla ortaya çıkan diğer bir grup sulfonilik asittir. Absorbe edilir ve idrarda serbest asit N-asetil türevleri halinde atılır (Bozkırlı, 2007).

Bazı çalışmalar sonunda sulfonlanmış naftelen azo boyalarının etkilerinin onların indirgenme ürünlerinden (bağırsakta bakteriyel flora yardımı) meydana geldiği ileri sürülmüştür. Bu boyaların sadece küçük bir oranı emilmektedir. Azo boyası bir memeliye ağızdan verildiğinde boya metabolizmasındaki ilk asama bağırsaktaki bakterilerle oluşan azo indirgemesidir. İncelemeler sonunda azo bileşiklerinin hepsinin memelilerin bağırsak sisteminde yeterince azaldığı bulunmuştur (Yaman, 1996).

Örneğin; Tartrazin ağız yoluyla alındığında sulfonilik açığa çıkar, fakat boya serbest halde idrarla atılmaz (Aksoy, 1984 ve Bozkırlı, 1997). Tartrazin'deki azalmanın mide ve bağırsak florası tarafından gerçekleştiğini göstermektedir. Tartrazin'in bağırsak florası tarafından metabolize edildiğini doğrulamıştı (Ekinci, 2011).

1.4. Gıda Boyalarının Toksik Etkileri;

Pek çok ülkede gıdalarda kullanılan gıda katkı maddelerine yönelik yoğun bir ilgi ortaya çıkmıştır. Sentetik gıda boyalarının toksisitesi uzun yıllardan beri tartışılmaktadır. İnsanlar üzerinde iki toksisite olayının görüldüğü 1950'lerin başlarına kadar gıdalarda kullanılan boya maddelerinin güvenliği üzerinde pek durulmamıştır (Thorley, 1984).

Siyah ve portakal renkli şekerlemelerin yenilmesi sonucu görülen diyare ile patlamış mısır yiyenlerde görülen katartik etki sonucunda FDA toksikoloji laboratuvarlarında önemli ölçüde kronik toksisite testleri uygulanmaya başlamıştır (Bozkırlı, 1997).

Deney hayvanları üzerindeki araştırmalarda yüksek dozlarda sentetik boyaların karaciğer, böbrek hasarına sebep olduğu gözlenmiş ve karaciğer hasarının uzun süreli denemelerde karaciğer tümör oluşumuna dönüştüğü görülmüştür. Önceden toksikolojik deneyler ölçü alınırken, tereyağlarında kullanılan bir boyanın sıçanlarda karaciğer kanserine neden olduğu ortaya çıkınca, boyaların kanserojen özellikleri üzerine araştırmalara başlanmıştır. (Thorley, 1984).

Alkolsüz içeceklerde, tatlı ve dondurmalarda, reel ve marmelatlarda, konserve meyvelerde, sütlerde, şekerlemelerde ve unlu gıdalarda sentetik boyalar kullanılmaktadır. Süt endüstrisinde aromalı sütler ve dondurmalarda kullanılır. Dondurma klahlarında ise sertifikalı boyalar kullanılmaktadır. Peynir endüstrisinde sertifikalı renk maddelerinin kullanımı uygun değildir ve boyanın stabilitesi korunamamaktadır. Bu nedenle peynirlerde doğal boyalar tercih edilir. Margarin ve tereyağında da doğal boyalar tercih edilmektedir (İçöz vd., 2008). Önceden toksikolojik deneyler ölçü alınırken, tereyağlarında kullanılan bir boyanın sıçanlarda karaciğer kanserine neden olduğu ortaya çıkınca, boyaların kanserojen özellikleri üzerine araştırmalara başlanmıştır (Demirer, 1974).

1.5. Gıda Boyalarının Genotoksisitesi;

Hücrelerde DNA ile etkileşime girerek olumsuz etki gösteren kimyasal maddeler genotoksik maddeler olarak adlandırılır (Ekinci, 2011). Kromozom mutasyonları ile ilgili genetik değişimler birçok insan genetik hastalıklarının sebebidir. Somatik hücrelerin onkogen ya da tümör süpresör genlerinde değişimlere sebep olan kromozom mutasyonları ve ilgili olayların insanlarda ve deney hayvanlarında kanserin uyarılmasında rol oynadığına dair birçok kanıt bulunmaktadır (Rime, 2013). Bakteri ya da ökaryot hücrelerde (gerçek bir çekirdeği olan hücreler) kromozom mutasyonları ya da hasarlanmalara neden olma yeteneği bulunan kimyasallar insanlarda da kansere neden olabilme özelliğini gösterir. Eğer herhangi bir kimyasalın bir ya da iki kez genotoksisitesine dair çalışma ya da çalışmalar mevcutsa o kimyasalın genotoksik olma potansiyelini gösterir. Sonuç olarak çeşitli pozitif genotoksik sonuçlar daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir (Lau ve McLean, 2006).

1.6. Gıda Boyalarının Karsinojenitesi

Boyaların doz güvenliğini belirlemek için yapılan tüm çalışmaların öneminin bilinmemesi ciddi bir problemdir. Tartrazin ile ilgili yapılan bir çalışmada, çok düşük seviyelerde karsinojenik aminler içerdiği de saptanmıştır (Öncül, 2009).

Üstelik birçok gıda maddesi Blue 1, Blue 2, Red 40, Yellow 5, Yellow 6 gibi gıda boyalarını ayrı ayrı ya da karışım halde içerebilir. Gıda boyasının olumsuz etkileri gıdaya eklenen diğer bir boyayla ya da gıda maddesindeki başka bir maddeyle artabilir (Sinerjik etki). Gıda boyalarının saf kimyasallar olmaması dikkate değer bir bilgidir. Boyanın yapımı ya da geliştirilmesi aşamalarında üretici firmada 4-aminobifenil, 4-aminoazobenzen ve benzidien gibi karsinojenlerle işleme tabi tutulabilir. Ancak gıda boyalarına eklenen bu tip karsinojenlerin güvenli ve bu nedenle önemsiz düzeyde olduğu düşünülmektedir (FDA, 1985). Bu şekilde düşük düzey kontaminantların herhangi bir karsinojen etkisi gıda boyalarıyla ilgili hayvan çalışmalarında test edilmedi (Hattis, Goble vd, 2005).

Boyaların her birini test eden Gıda ve İlaç Uygulayıcıları (FDA) kimyagerleri bu boyaların doz toleransını onaylayacak aşamaya henüz ulaşamamıştır. Maalesef, bu uygulayıcıların işlemleri dahi gıda boyalarıyla ilgili problemlerin sırrını çözememiştir. Birinci problem; 1990' daki gıda boyası kullanımına göre bu yıldan sonra her kullanım başına %50 oranında boya kullanımında artış vardır. İkincisi; FDA karsinojenlere daha hassas olan küçük çocuklarda risk artışını ve çocukların daha fazla gıda boyası tüketmelerinin yetişkinlerden daha fazla ağırlık artışına neden olduğunu göz ardı etmiştir. Üçüncüsü ve en önemlisi; FDA ve Kanadalı bilim adamları kimyasal olarak bağlı benzidin maddesinin büyük oranda kalın bağırsakta serbest benzidine dönüştüğünü gösterdiler.

Dördüncü problem; FDA' nın her bir boyanın bağımsız oluşturduğu riskten çok tüm boyaların kümülatif risk ini hesaba katması gerekir. Gerçekte Kanadalı bilim adamları kimyasal yapıdaki kanserojenleri alkolsüz içeceklerde ve sert şekerlerde buldular (Peiperl, Prival vd., 1995; Lancaster ve Lawrence 1999).

1.7. Gıda Boyalarının Nörotoksitesitesi;

2004' te yapılan çoğu çalışmanın sonucu analiz edildiğinde; gıda boyaları ve hiper aktivite arasında sebep ve etki ilişkisi bulunmaktadır. San Francisco allerjisti Benjamin Feingold gıda boyaları ve gıdalardaki diğer bazı sentetik doğal bileşenlerin çocuk ve yetişkin hastalarda hiper aktivite ve diğer davranış bozukluklarına neden olabileceğini göstermiştir (Schab ve Trinh, 2004).

İngiliz Hükümeti tarafından desteklenen son iki çalışmada İngiliz çocuklarının kesitlerindeki dört boya karışımı (gıda koruyucusu olarak da sodium benzoat içerir) nın hiperaktivite bulunmayan çocuklarda dahi davranış bozukluğuna neden olduğu bulundu (Bateman, Warner vd., 2004; McCann, Barrett vd., 2007).

1.8. Sentetik Gıda Boyalarının Kullanıldığı Gıdalar

Gıda işletmelerinde sentetik gıda boyalarının kullanılması birçok faktörlere de dikkat etmeyi gerektirmektedir. Şekerleme ürünlerinde ve fırında yüksek ısıda pişen yiyeceklerde bazı problemler çıkabilmektedir. Toksik ve karsinogenik olarak değerlendirilen renklendiricilerin kullanımı yasaklanmıştır. Geriye kalan renklendiricilere ilişkin sağlık sorunları duyarlı kişilerde genellikle allerjik reaksiyonlar ve deri döküntüleri, astım ve hiper aktivitedir (Adams, 1992). İngiltere et, balık, kümes hayvanları, meyve ve sebzeler, çay kahve, şarap, süt, bal gibi çiğ veya işlemiden geçirilmemiş yiyeceklerle herhangi bir renk eklenmesini yasaklamıştır (Bozkırlı, 2007). Ayrıca kullanılmasına izin verilen gıda katkı maddelerine uzun süreli maruz kalınması durumunda da toksik etkiler ortaya çıkabilmektedir. Bu katkı maddeleri gelişigüzel miktarlarda ve tüzük dışı olarak gıdalarda kullanıldığı zaman halk sağlığı açısından zararlı olabilir (Briggs, 1997 ve Bozkırlı, 2007).

GKM' lerin hiç biri, hangi amaçla gıdaya katılmış olursa olsun; insan sağlığına zarar vermemelidir. Kullanılacak katkı maddesi hakkındaki analiz sonuçları ve kullanılma miktarları bilinmelidir. GKM katıldığı yiyecek veya karışımın besleyici değerine zarar vermemeli, besin değerini azaltmamalı ve değiştirmemelidir. Tüketicinin bu düşüncesine sebep olan faktörlerden biri de istenilen etkiyi oluşturacak teknik miktardan fazla kullanmadır. Yani gıda boyalarının doza bağlı olarak tüketiminin

gerekliliğine olan inanç mevcuttur. Gıdanın içindeki vitaminleri tahrip etmemeli, besinlerin emilimini azaltmamalıdır. Sentetik boyaların gıdalarda kullanılmasının uygunluğu ve emniyeti hakkında sorular ortaya çıkmış ve bazılarının kullanılması engellenmiş veya sadece uygun olanın kullanılmasına izin verilmiştir (Erden ve Çalışkan, 2003).

Bu çalışmada farklı konsantrasyonlardaki 2 farklı gıda boyasının [(E132+E 102 Dark Green CI 19140+CI 73015) ve (E133 Brilliant Blue CI 42090)]'nın bağırsak florası üzerine etkisi incelenmiştir. Brilliant Blue ve Dark Green her ikisi de Türkiye’de kullanımına izin verilen boyalar ve kullanıldıkları gıdalar verilmiştir (Bozkırlı, 2007)

Tablo 1.6: FDA ve Avrupa Birliği tarafından gıdalarda kullanılmasına izin verilen bazı sertifikalı boyalar (Downham ve Collins, 2000).

Adı	Renk Tonu	FD&C	E Kodu
Brilliant Blue	Türkuvaz mavi	FD&C Blue No.1	E 133
Indigotine	Deniz mavisi	FD&C Blue No.2	E 132
Tartrazine	Limon sarısı	FD&C Yellow No.5	E 102

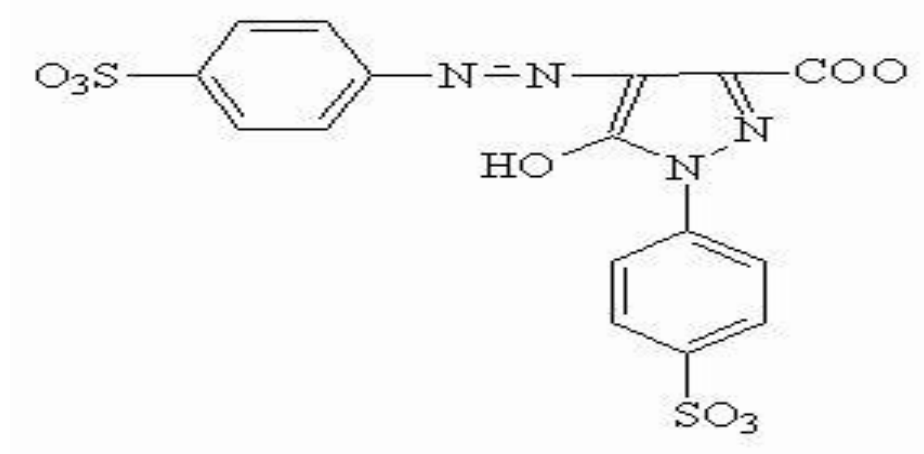
Tablo 1.7: Sentetik gıda boyalarının numaralandırmaları ve bazı yorumlar. (Bozkırlı, 2007).

Numara	İsim	Yorum
E133	Brilliant Blue FCF	FD&C Mavi No.1; mandıra ürünleri, tatlılar ve İçeceklerde kullanılır, Belçika, Fransa, Almanya, sviçre, sveç, Avusturya ve Norveç'te yasaklandı.
E102	Tartrazine	FD&C Sarı No.5; astım krizine (FDA bunu onaylamasa da) ve çocuklarda kurdesene (FDA'nın tahmini 1/10000) neden olduğu bilinir; ayrıca tiroid tümörü, kromozom hasarı, kurdeşen, hiperaktivite ve aspirin duyarlılığı ile de ilişkilendirilir; renkli içecek, tatlı, reçel, tahıl, çerez, konserve balık ve hazır çorbalarda kullanılır; Norveç ve Avusturya'da yasaklandı.
E 132	Indigotine Indigo carmine	FD&C Mavi No.2, sentetik kömür katranı türevidir; yaygın olarak tablet ve kapsüllere eklenir; ayrıca dondurma, tatlı, fırınlı mamuller, şekerleme ve bisküvilerde kullanılır; bulantı, kusma, yüksek tansiyon, deri döküntüsü, solunum sorunları ve diğer alerjik reaksiyonlara neden olur. Norveç'te yasaklandı.

1. Dark Green İçindekiler

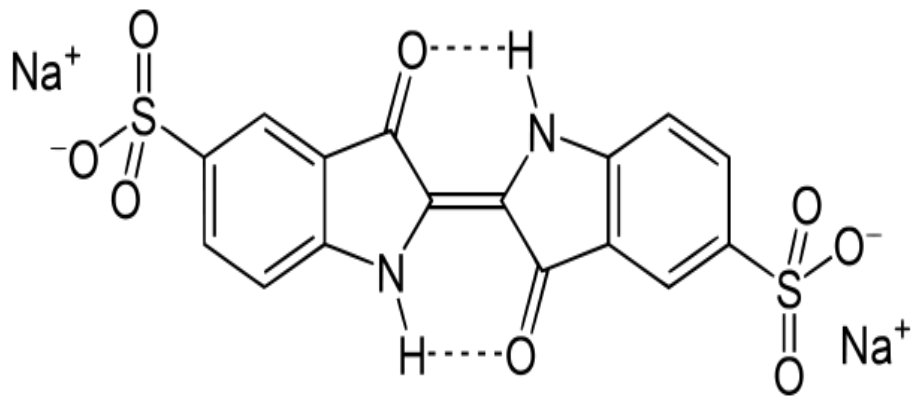
renklendirici karışım (E102+E132) CI 19340+CI 73015 yeşil renklendirici. Şekerlemeler 300 mg/ kg, Süsleme ve kaplama maddeleri 500mg/kg ve çorbalar için 50mg/kg kullanılır. Tartrazine (E-102) azo boyası sentetik gıda boyaları sınıfındadır ve gıda kodeksinde müsaade edilen mamüllere sınırlı miktarlarda kullanılmaktadır. Dondurma, buzlu içecekler, şekerleme, jöleler, aromalı içecek, sakız, pastacılık vb birçok gıda üretiminde kullanılmaktadır.

Gıda haricinde ilaç, kozmetik, temizlik ürünleri, renkli taş, oyun hamuru vb. insanla temas eden birçok ürünün renklendirilmesinde de kullanılır (Ronald ve Saimon, 2003).



Şekil 1.8: E 132 Tartrazine genel yapısı

İndigocarmine boyaları (E-132), Çoğunlukla pH göstercisi olarak kullanılır. 11.4 pH seviyesinde mavi, 13,0 pH seviyesinde ise çözeltiye sarı renk verir. İndigo karmin aynı zamanda yükseltgenme belirteci olarak da kullanılır, yükseltgenme (redüksiyon) sırasında sarı renge doğru döner. Ayrıca çözünmüş ozonu bulma sırasında da kullanılır. Son olarak da kapsül üretimi sonrasında boya olarak kullanılır (Kettle vd., 2004).



Şekil 1.9 : E-132 indigo carmine genel yapısı

2. Brilliant Blue FCF (Blue 1) No. 1 E133

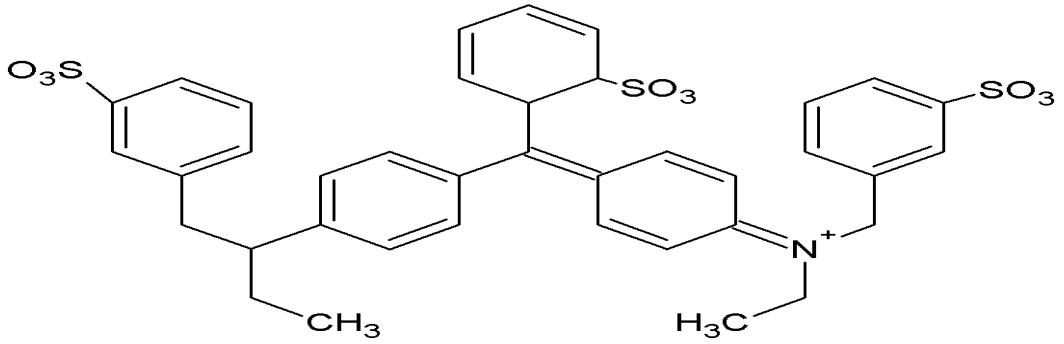
Brilliant Blue FCF, CI 42090, Renklendirici kullanılmasına izin verilen gıdalar ve bu gıdalarda renklendiriciler inbulunabileceği maksimum miktar, 25/08/2002 tarihli 24857 sayılı Resmi Gazete’de yayımlan ‘Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği’ne göre verilmiştir.Şekerlemeler 300 mg/ kg, süsleme ve kaplama maddeleri 500mg/kg ve çorbalar 50mg/kg kullanılmıştır. Bu kullanım dışında sabunlarda, şampuanlarda, ağız gargaralarında ve diğer hijyen amaçlı ürünler ile kozmetik ürünlerde ve gıda endüstrisinde renklendirici olarak kullanılmaktadır.

Gıdalarda genellikle dondurmalarda, bezelye konservelerinde, süt ürünlerinde, şekerlemelerde ve içeceklerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun dışında tekstil ve deri sanayinde de kullanılabilmektedir (Metal, 2006).

Brilliant Blue FCF boyası suda çözündüğünde parlak mavi renk veren bir gıda boyasıdır ve kimyasal formülü $C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$ şeklindedir. Petrolden elde edilen aromatik hidrokarbonların kullanımı ile üretilen sentetik bir boyadır. Genellikle disodyum tuzu formunda bulunur. Brilliant Blue FCF karsinojenik, nörolojik bozukluklara ve üreme bozukluklarına, çeşitli alerjilere, döküntüleri de kapsayan anafaktik reaksiyonlara, nefes alma ve yutkunma güçlüklerine sebebiyet vermektedir. Bazı hastalarda astımın tetikleyicisi olabilmektedir (Gupta vd., 2006).

Bu boya yeşilin çeşitli tonlarını üretmek için tartrazinle birleştirilir. Mavi renkli, Brilliant Blue FCF daha çok dondurmada, bisküvilerde, işlenmiş bezelye konservelerinde, paket çorbalarda, şişelenmiş gıda renklendiricilerinde, buzlu yiyeceklerde, mavi ahududu aromalı ürünlerde, günlük ürünlerde, tatlı ve içeceklerde özellikle likör ve mavi curaçao da bulunur (Basım, 2004).

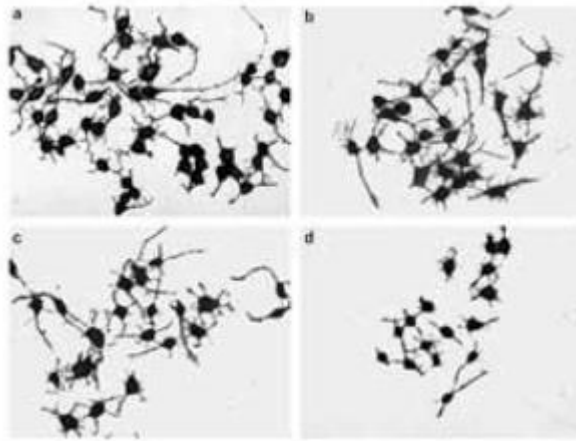
FDA; 2003 yılında, ABD’ de besleyici solüsyonlardaki sentetik boyaların potansiyel toksisitesi ile ilgili sağlıkçıları uyarmak için bir halk sağlığı broşürü yayınladı. FDA Avrupa (E133 diye anılıyor) ve diğer ülkelerde Brilliant Blue için günlük maksimum kabul edilebilir alım miktarını 12 mg/kg/gün’ ün 1 tanesi olarak önermektedir: Bu değer 36 kilo ağırlığında bir çocuk için 360 mg/gün’ e denk gelir. Günlük ortalama boya üretimi 3 mg/kişi/gün’ e denk gelir [sadece çocuklar değil tüm popülasyona dayalı bir rakamdır (Hess ve Fitzhugh, 1955)].



Brilliant Blue

Şekil 1.10: Brilliant Blue FCF genel yapısı

Brilliant Blue FCF boyasının üç sülfonik grubunun olması (Şekil 1, 10) boyaya iyonik özellik ile sulu ortamda kolay çözünebilme özelliklerini vermekte ve bu da boyanın toprağa ve suya rahatça karışmasını sağlamaktadır. Ayrıca boyanın parçalanması sonucu amino ürünleri ortaya çıkmakta ve bu da suda büyük oranda toksisiteye sebep olmaktadır (Mital, 2006). İnsan sağlığına olan zararları dolayısıyla Avusturya, Belçika, Danimarka, Fransa, Yunanistan, İtalya, Norveç, İspanya, İsviçre ve İsveç'te bu boyanın kullanımı geçmişte yasaklanmıştır (Gupta vd., 2006).



Şekil 1-11: Nöron Lau, K., W. G. McLean, *et al.* (2006).

Sinirsel gelişimi üzerinde Blue 1 boyası ve L-glutamik asitin (monosodyum glutamate eklenmiş gıdalar) ayrı ayrı ve birlikte potansiyel etkileri araştırılmış, Lau

vd., (2006) bu iki gıda katkı maddesinin varlığı ve yokluğunda nöronlara farklılaşan ve nöronal büyüme gösteren NB2a nöroblastoma hücrelerini kullandılar. Nörotoksisite ölçümü NB2a hücrelerinin büyümesinin inhibisyonu şeklinde ölçüldü. Ayrı ayrı kullanıldıklarında; L-glutamil asitin yarı maksimal inhibitör konsantrasyonunu 48.7 μ M olarak tespit ederken; Blue B1' in yarı maksimal inhibitör konsantrasyonunu 0.0514 μ M olarak bildirmişlerdir. Hücreler bu iki gıda katkı maddesi birlikte uygulandığında ayrı ayrı uygulandıklarında görülen etkiden daha güçlü etkilendiler. Çalışmanın sonucunda gıda katkı maddelerinin birlikte uygulandıklarında insan hücreleri için daha zararlı olabileceği fikrine ulaşılmıştır (Lau vd., 2006).

1984' te SCF; ADI' nın günde vücut ağırlığına oranla kullanılabilecek dozuna dair uzun süreli bir çalışma yapmıştır. Elde ettikleri sonuçlara göre bu maddenin (ADI) emilimi, vücutta dağılımı, metabolize edilmesi, salgılanması, genotoksisite, gelişimsel ve uzun süreli toksisite, kanser oluşumuna neden olma gibi özellikleri nedeniyle günde 10 mg/kg dozda kullanımı uygun bulunmuş ve ADI' nın kullanımında bu haliyle değişiklik yapılmıştır (EFSA, 2010).

Toksikoloji'nin kurucusu Paracelsus (1473) zehiri şöyle tanımlamıştır: "Bütün maddeler zehirdir. Zehirli olmayan bir madde yoktur. Doğru kullanım (doz) ilaçla toksin arasındaki farkı gösterir (Boyacıoğlu, 2011). Buradan hareketle gıda boyaları açısından risk/yarar dengesi dikkate alındığında doz çalışması önemli bir yer tutar. Bağırsak mikrobiyotası memeliler, kuşlar ve biz insanların simbiyotik ilişki halinde bulunduğumuz mikroorganizmalardan oluşur. Bu mikroorganizmaların gelişiminin herhangi bir etkenle önlenmesi immün modülasyonun tahribinden obeziteye kadar ciddi sorunlara neden olur (Boyacıoğlu, 2011). Kalın bağırsaktaki mikrobiyotanın çoğunu bakteriler oluşturur. *Escherichia coli* memelilerin, kuşların normal bağırsak florasındayışayan faydalı bir bakteri olup, koli basili olarak bilinir. Bağırsak mikrobiyotası antibiyotikler, bağırsak dolaşım sisteminin bozulması, yemek yememe ve bağışıklık sistemi yetersizliği nedeniyle bozulabilir. Bozulan bir bağırsakta patojenlerin sayısı artar, detoksifikasyon yapacak yararlı florasının bulunmaması sonucu toksik maddeler birikir (Çiftçi, 2011) .

1.9. Bağırsak Mikro florası;

Gastrointestinal sistemde bulunan bakteri florasının insan sağlığı açısından birçok yönden faydaları bulunmaktadır. Sindirim sisteminde yaşayıp konak organizmanın sindirimiyle ilgili çeşitli yararlı işlevler gören mikroorganizmalardır. Ayrıca flora içindeki bakteri çeşitliliği kadar popülasyon dengesi de önem taşımaktadır. Bazı türlerin besinlerimiz ile alınan toksik etkileri dengeyi bir başka türün lehine çevirebilmektedir. Yine aynı etki alınan antibiyotikler nedeni ile de gerçekleşebilmektedir. Dolayısıyla bu durum insan sağlığı açısından oldukça önem taşımaktadır. Bozulan bir bağırsakta patojenlerin sayısı artar, detoksifikasyon yapacak yararlı floranın bulunmaması sonucu toksik maddeler birikir. Ortalama bir insan vücudunda 10^{13} hücre varken sindirim sisteminin içindeki mikroorganizma sayısı bunun on katı kadardır (Guarner ve Malagelada, 2003; Sears, 2005). Bakteriler kalın bağırsaktaki floranın çoğunu, dışkıının da %60'ını oluştururlar (Gardner ve Malagelada, 2003). Sindirim kanalında yaşayan tür sayısı tahminen 300 ila 1000 arasında olup, çoğu uzmanın görüşü bunun 500 dolayında olduğudur . Ancak bunların % 99'u 30-40 türe ait olmaları muhtemeldir (Beaugerie ve Petit, 2004). Bağırsak florası ile insanlar arasındaki ilişki simbiyotik ve mutualistiktir, her iki tarafa da yarar sağlar (Gibson, 2004).

Bu çalışmada, gıda boyalarının *Escherichia coli* üzerine etkisi araştırılmıştır. *Escherichia coli*, Enterobacteriaceae (1,5µm' den küçük) ailesine mensuptur; gram negatif ve çubuk şeklinde bakterilerdir ve hem aerobik hem anaerobik ortamlarda hızla gelişir. Enterobacteriaceae ailesi içerisinde yer alan organizma grupları şu özellikleri taşır: oksidaz negatif olma, katalaz pozitif olma, halofilik olmama, spor şeklinde olmama, peritris kamçısı ile genelde hareketli olma ve nitratı nitrite düşürme yeteneğine sahip olma ve yaygın bir antijen üretme (Neidhardt, 1996).

E. coli, genelde içme suyu kaynaklarının atıksal kontaminasyonunun belirtecidir, çünkü *E.coli*, sürekli, insan gastrointestinal kanallarına predominant olarak fakültatif yerleşimlidir. Ayrıca, *E.coli* 'nin denetlenmesi ve sayılması kolaydır (Foppen ve Schijven, 2006).

Çoğu *Escherichia* türü zararsız kommensal bakteriler olmalarına karşın aralarında insan için hastalık oluşturu (patojen) olanları da vardır. *E. coli*, *Escherichia*

türlerinin neden olduğu hastalıkların en başlıca sorumlusudur, basit ishalden dizanteri benzeri vakalara kadar uzanan önemli bağırsak hastalıklarına neden olabilir. İdrar yolu hastalıklarının büyük bir çoğunluğu da *E. coli* tarafından meydana gelir. Ancak, bu cinsin diğer üyelerinin de insan hastalıklarında rol oynadıkları gösterilmiştir (Chaudhury vd., 1999).

Bakterilerde "suş", ortak özellikleri ile başka suşlardan ayırt edilebilen bir gruptur. Bu farklılıklar genelde moleküler düzeyde algılanabilse de bakterinin fizyolojisi ve yaşam döngüsüne etki edebilirler, örneğin patojenliğe yol açabilirler. Farklı *E. coli* suşları farklı hayvanlarda yaşadıkları için sudaki dışkı kirlenmesinin kaynağını anlamak mümkündür. Yeni *E. coli* suşları doğal mutasyonlar sonucu sürekli olarak belirmektedir ve bunların bazılarının özellikleri içinde bulundukları konak hayvana zararlı olabilir. (Chaudhury vd., 1999).

Çoğu sağlıklı insanda böylesi yeni bir *E. coli* suşu hafif bir ishale yol açsa da, küçük çocuklarda, başka bir hastalıktan dolayı zayıf düşmüşlerde veya bazı ilaçları alanlarda ciddi bir hastalık hatta ölüm meydana gelebilir. *E. coli* suşlarını tanımlamanın bir yolu yüzeyindeki antijenlerdir. "O" bakterinin yüzeyindeki, "H" de flagelladaki antijeni belirtir. Bu teknikle tanımlanan tiplere *serotip* denir. Bir serotip genetik anlamda homojen olmasa da genelde belli serotiplerin hastalık etkileri aynı olduğu için halk sağlığı ve tıbbi mikrobiyoloji açısından pratik bir sınıflandırma yöntemi olarak kullanılırlar. *E. coli* serotipleri arasında ölümcül olabilmesinden dolayı en ün yapmış olanı O157:H7'dir (Koşoğlu ve Yaman, 2011).

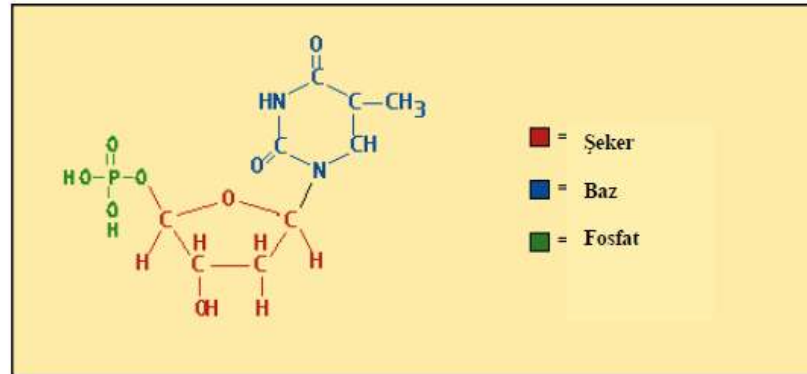
E. coli türünün içinde büyük bir çeşitlilik vardır. Bu, kısmen farklı ortamlarda yaşayan bakterilerin ufak mutasyonlar biriktirerek farklılaşmasından dolayı olsa da, çeşitliliğin büyük bir bölümü bazı genlerin başka bakterilerden ediniminden meydana gelir. Çeşitli patojen *E. coli* türlerinin farklı suşlardan kaynaklandıkları, bunların birbirlerinden bağımsız olarak virülans genlerini "yatay transfer" yoluyla elde ettikleri gösterilmiştir. Genomunda "genetik ada" olarak adlandırılan bölgelerde dışardan alınma genler kümelenir. Shigella türlerinin patolojik *E. coli* türlerinden evrimleştiği düşünülmektedir (Baron, 1996).

Bu bileşikler dikkatsiz ya da tasarlanmış olarak vücuda alındıklarında bağırsak sistemine girdiği zaman bağırsak mikroorganizmaları tarafından aromatik aminlere

metabolize edilirler. Karaciğerdeki indirgeyici enzimler aromatik aminleri üretmek için azo bağı indirgeyici parçaları katalizleyebilir. Üstelik azo indirgenmesinde bağırsak mikrobiyal azo redüktaz enziminin karaciğer enzimlerinden daha önemli olabildiği bir gerçektir (Chung, 1983). Deneysel hayvanlar ya da insanların çekal ve fekal içeriğinden izole edilen anaerobik bakterilerin çoğu aromatik aminleri üretmek için azo bağlarını parçalama yeteneğine sahiptir. Azo redüktazlar bu reaksiyonları katalizler ve bu enzimlerin oksijene duyarlı olduğu ve optimal aktivite göstermesi için flavinlere gereksinim gösterdiği bilinmektedir (Chung vd., 1992).

Biz bu tez çalışmasında test mikroorganizması olarak *Escherichia coli* ATCC 10799 bakterisini kullandık. Bu bakteri gıda boyalarının etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda özellikle de *Enterobacteriaceae* familyasına ait bir bakteri olarak ve klinik öneminden dolayı sıklıkla tercih edilmektedir. Bu bakteri mikrobiyoloji laboratuvarlarının stok kültürü olarak kolayca ve yaygın olarak bulunmakta ve çalışmada kullanılacak moleküler metodlar bakımından da plasmid dahil tüm genomu dizilenmiş bir organizma olması nedeniyle iyi bir indikatördür (Clifford vd., 2012).

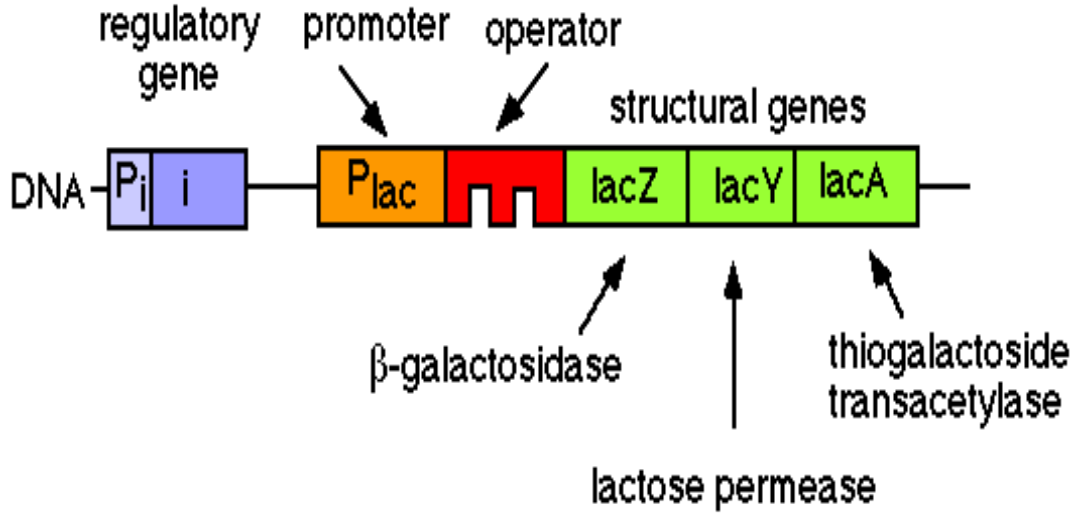
Nükleik asitler (DNA, RNA), yaşam bilgilerini içeren, bunları saklayan ve proteine dönüştürülmesini gerçekleştiren biyopolimerlerdir. İki tür nükleik asit vardır. Bunlar; Deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA)'dır. Nükleik asitler diğer polimerlerde olduğu gibi, dehidrasyon sentezi ile birleşen monomerlerden oluşmuştur. Nükleik asit monomerleri-nükleotitler-üç birimden oluşmuştur. Bunlar bir azotlu baz, bir şeker ve bir fosforik asittir. Şekil 1.3'de bir nükleotit biriminin yapısı gösterilmiştir (Lehninger, 1979).



Şekil 1.12 : Nükleotit biriminin yapısı

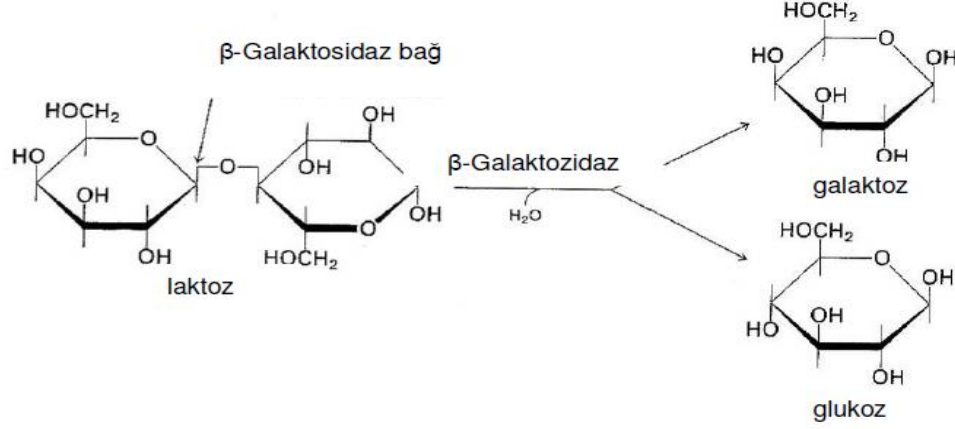
Bu çalışmada insan bağırsağında bulunan *E.coli* bakterisinin laktoz şekeri sindirim metabolizmasını düzenleyen *lacZ* geni incelendi. Bilim adamları daha karmaşık sistemleri anlamak için *E. coli* bakterisini model organizma seçerek metabolizmasının ayrıntılarını incelemişlerdir. Eğer gıda boyasının bakteri üzerindeki metabolizma aksaklıklarının sebebi ayrıntılı incelenirse insan gibi kompleks organizmada da gıda boyasının oluşturduğu sorunlar ortaya çıkarılabilir.

Laktoz adlı şekerin *E. coli*'de kullanımı açıklığa kavuşturmuş olan *lac* operonu modeli gen sunumunun represyon veya indükleme yoluyla düzenlenmesine en iyi örnektir, (Ustaçelebi vd., 1999). 1960'ta François Jacob ve Jacques Monod ve meslektaşları *lac* operonu modelini *E. coli*'de tanımladılar, (Lodish vd., 1997). *Lac* operonu, laktoz metabolizmasının ihtiyaç duyduğu Y, Z ve A genini içerir. Lac Y geni, *E. coli* hücre membranı aralığı ve hücre içinden laktoz pompalanması için elektokimyasal gradiyentinden enerji kullanı için laktoz permeaz'ı şifreler. Lac Z geni, β -galaktosidaz'ı şifreler (Lodish vd., 1997).



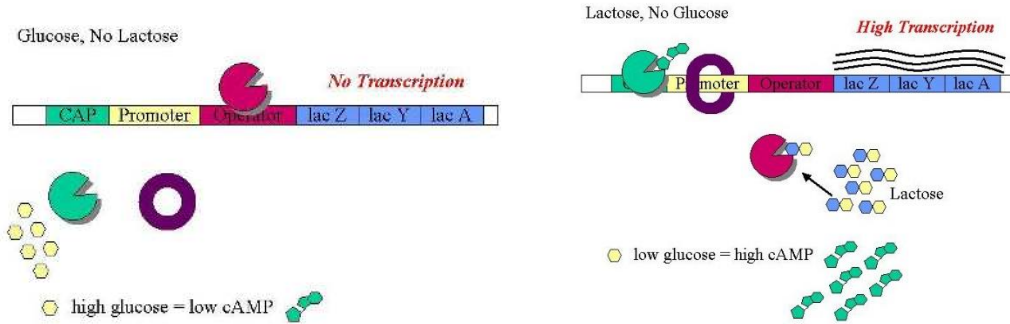
Şekil 1.13: *E.coli* 'nin *lac* operonu

β _ galaktozidaz laktoz disakkaritini glukoz ve galaktoza parçalar. LacA geni tiyogalaktozit transasetilazı'nı şifreler. Bu üç enzim fiziksel olarak birbirleriyle bağlantılı durumdadır.



Şekil 1.14: Laktoz'un β _galaktozidaz tarafından galaktoz ve glukozu parçalanması (Lodish vd., 1997)

E. coli laktoz ve bazı spesifik laktoz analogları ile birlikte olunca β -galaktozidaz, galaktozit permeaz ve tiyogalaktozit transasetilaz aktivitelerinin ifadesi 10-100 misli kadar artmaktadır.



Şekil 1.15: *E.coli*'de katabolit represyon

E. coli karbon kaynakları olarak laktoz ve glukoz ile karşı karşıya kalınca, organizmalar önce glukozu metabolize eder, sonra lac operon genleri laktozu metabolize etme yeteneğini sağlamak için uyarılıncaya kadar bunlar gelişimlerini geçici olarak durdururlar.

Laktoz her ne kadar bakteriyel büyüme fazının başlangıcından itibaren mevcutsa da, hücre glukoz tükenene kadar laktoz katabolizması için gerekli olan enzimleri indüklemeyebilir (Murray vd., 1993).

Bu çalışmada gıda boyalarının bağırsak mikrofloramızın bir üyesi olan *E. coli* gelişimi üzerine etkilerinin belirlenmesini amaçladık. Bu nedenle Real Time PCR (Gerçek Zamanlı PCR) kullanılmıştır. Son yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, real-time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Real-time PCR’da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Real-time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problemlerden yararlanılmaktadır. Bir flöresin röportörün kantitasyonu ve tanısı üzerine kurulu PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artış (CT - threshold cycle) hedef template’in başlangıç miktarı ile orantılıdır (Çiftçi, 2011).

BÖLÜM 2

2. KONUYLA İLGİLİ YAPILAN DAHA ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

JECFA (1966) Tartrazin'in *Escherichia coli* kültürlerinde mutajenik etkisinin test edildiği bir çalışmada, hiçbir mutajenik etkisinin gözlenmediğini açıklamıştır (Lück ve Rickerl, 1960).

Mikrozomların bulunmadığı çeşitli sistemlerde, Spesifik olmayan DNA hasarını içeren ve mutajenitenin olmadığı durumlarda Brilliant Blue renklendiricisi, memeli hücrelere transformasyon yeteneğini kaybeder. Brilliant Blue ve Tartrazin boyalarının ikisi de bu tip transformasyon ve bakteri mutasyon sisteminde inaktiftir. Daha ileri araştırmalar için bu iki boyanın mutajenite çalışmalarına ihtiyaç vardır (Price vd., 1978).

Phillips ve ark. (1980) rat, fare ve kobayların tek oral dozdan sonra C₁₄ışaretili Green ve Brilliant Blue FCF'nin metabolizması ya da emilimini geri kaybettiğini ortaya çıkarmışlardır.

Pollock, (1980) ve Lewis, (1984) yapılan çalışmalarda, bazı gıda katkılarının ve salisilatların hiperaktivite, öğrenme bozukluğu gibi davranış bozukluklarına neden olduğunu ortaya koymuşlardır.

Chung (1983) gıda boyalarının kullanılan ülkelere göre değiştiğini ve hastalığa sebep olma olasılığını değiştirdiğini belirtmiştir. Örneğin gelişmiş sanayi ülkelerinde bağırsak kanseri arttığı için gıda tüketimindeki boyalar üzerine dikkat çekilmesinin gerektiğini açıklamıştır.

Karpiluk vd., (1984) Tartrazin ve indigo karmin boyalarının sıcak kanlı hayvanlarda (farelerde) ve mikrobiyal bir modelde mutajenik aksiyonu üzerine çalışma yapmışlardır. *E. coli* üzerinde toksisite ve mutajenik aksiyonu belirlenen boyaların

kemik iliğinin kromozomal analizi sonucunda CBA X C57BL/6 farelerde dominant letal doz araştırılmıştır. Tartrazin için günlük doz miktarı 400 mg/kg güvenli olarak belirlenirken, indigo karmin için 50 mg/kg güvenli belirlenmiştir.

A.B.D.'de yapılan bir çalışmada suda çözünebilir azo boyalarının barsak bakterileriyle azalmadığı rapor edilmiştir (Anderson, 1988).

E. coli (Karpliuk vd., 1984; Henschler ve Wild, 1985; Pollastrini vd., 1990)' de yapılan *in vitro* çalışmalarda mutajenik aktiviteye rastlanmadığını rapor etmiştir.

Aksoy, (1984) ve Chung, (1992) araştırmacılarının yaptığı çalışmalara göre bazı suda çözünür azo boyalarının büyük bir çoğunluğu safra ile atılmaktadır.

Lin ve Solodar (1987), bazı azo boyaların mutajenitesinin boya yapısı ve aktivitesi arasındaki ilişkiye bağlı olduğunu gösteren bir çalışma yapmayı amaçlamışlardır. Bu çalışmada azo boyalar S9 mix ve p-fenilendiamin ile birlikte ortama verildiği zaman mutajenik etki göstermişlerdir. Bu sonuçlara göre azo boyaların mutajenik etki göstermelerinin sebebi p-fenilendi aminin okside yapısında bulunmasıdır.

(Collins, 1992) Bazı çalışmalar sonunda azo boyalarının etkilerinin bağırsaklarda bakteriyal flora yardımı ile meydana geldiği ileri sürülmüştür. Başka bir çalışmada sulphanilic halkasının, insanlar ve ratlarda hiperaktivite geliştirdiği ve çinko metabolizmasını da hızlandırdığı ileri sürülmüştür.

(Chang vd., 1992) Azo boya bileşikleri yanlışlıkla ya da bilerek alındığında vücuttaki sindirim sistemine giriş yaparlar, bu boyalar bağırsak bakterileri tarafından aromatik aminlere metabolize edilirler. Karaciğerdeki indirgeyici enzimler aromatik amin üretmek için azo zincirinin ayrılmasını katalize edebilirler. Ancak deliller azo indirgenmesinde bağırsak mikrobiyal azo redüktazın karaciğer enzimlerinden daha önemli olabileceğini göstermiştir.

Brilliant Blue ve Patent Blue boyalarının rat bağırsak mikroflorası tarafından *in vitro* metabolik faaliyetlere dirençli olduğunu gösteren gözlemler sonucunda bu boyaların

mide bağırsak yolunda metabolizmalarını kaybettiklerine dair temel bir görüş birliği vardır. Üstelik bu boyaların mutajenite özelliğini kaybetmesi beklenmez. Çünkü test mikroorganizmalarından kaynaklanan herhangi bir detoksifikasyon nedeniyle eğer ortamda renklendiriciler varsa renk açılması görülmez (Hess ve Fitzhugh, 1995).

Bariz bir metabolizma inkübasyon süresince pH değişiklikleri nedeniyle olabilir. Bu boya asit şartlara duyarlı diğer trifenilmetanazlar gibidir (Hess ve Fitzhugh, 1995).

Brown,(1997) bir katkı maddesi herhangi bir dozda kansere neden oluyorsa, katkı maddesi olarak besine katılmamalıdır. Katkı maddeleri laboratuvar hayvanlarında yüksek dozda, kansere neden olabilirler ancak uygun miktarlarda kullanıldıklarında emniyetlidirler şeklinde açıklamıştır.

Çalışmalar gıda renklendiricilerinin böbrekte, allerjen etkisi olanlarda ve mide bağırsak kanserinde sağlığa zararlı etkilerinin bulunduğunu gösterdi. Gıda renklendiricilerinin *in vitro* insan lenfositlerinde toksik olduğu ve bu hücrelerde direkt olarak DNA' ya bağlandığı görüldü. Metanil yellow ve indigo karmin olarak isimlendirilen iki gıda boyasının indirgeyici ve hidrolitik aktiviteleri enterik bakterilerin farklı suşları tarafından test edildi. *E. coli* ve *Vibrio spp.* türleri 3 saatten sonra gözle görülür bir indirgeyici aktiviteye sahip iken, diğer enterik bakteriler inkübasyonun başlangıcından itibaren artmış bir aktiviteye sahipti. Maksimum indirgeyici yeteneğe sahip *Enterobacter cloacae* ' ı takiben *Enterobacter aerogenes* ve *E. coli* deindirgeyici güce sahipti. 10 saatlik inkübasyon sürecinde indigo karminin hidrolitik aktivitesinin elde edilmesinde enterik bakteri ırkları daha iyi bir yanıt vermiştir. Normalde bağırsak mikroflorası tüketicilerde sağlık problemlerine yol açabilir (Singh vd., 1997).

Sasakia vd., (2002) yapmış oldukları çalışmada, tartrazin ve eritrosinin de arasında bulunduğu 39 gıda katkı maddesinin comet testi tekniğiyle fare organlarındaki genotoksik etkisini araştırmayı amaçlamıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre tartrazin ve eritrosin, midede DNA hasarına neden olduğu saptanmıştır.

Das ve Mukherjee (2004) gıda boyalarını steril distile suda farklı konsantrasyonlarda (10, 100, 250, 500 ve 1000 µg /pleyt) çözmüşlerdir. Genotoksisite testi yapılan dört hayvana intraperitoneal uygulanan 50, 100 ve 200 mg/kg vücut ağırlığında amaranth ve tartrazin dozlarının mutajenik ve genotoksik olmadığı bulundu.

Price vd (2006) Amerika’da kullanılması onaylanan azo boyalar grubuna giren 8 gıda boyasının (blue 1, blue 2, yellow 1, yellow 5, yellow 6, red 3, green 3) farelerde in vivo olarak kanserojenitesini araştırmayı amaçlamışlardır. Fisher, fare embriyolarında bazı boyaların (blue 1, red 3, yellow 5) habis oluşumunu uyardığı ve ölümlere yol açtığını görmüştür. Boya kombinasyonlarında ise tümör oluşumu ve fare ölümleri artmıştır. Çalışmanın sonucuna göre bu gıda boyalarının kanserojen olduğu açıklanmıştır.

Poula vd., (2009) amarant, sunset sarı, tartrazin gibi azo boyaların fare barsak hücrelerini genotoksik olarak nasıl etkilediğini MN testi ile araştırmışlardır. Boyaları farelere gavaj yöntemiyle ile 24 saatlik periyotlarla vermişlerdir. Bu çalışmanın sonucuna göre boyaların sadece en yüksek dozu mikronukleus oluşumunu uyarmıştır. Tartrazin’in 2000 mg/kg doza kadar bağırsak hücrelerinde mikronükleus tayininde genotoksik etkiye neden olmadığı gözlenmiştir.

Kobylewski ve Jacobson, (2010) çeşitli in vitro testlerde Blue 1 boyasının nörit büyümesini inhibe ettiğini ve L-glutamik asit (potansiyel bir nörotoksiktir) sinerjistik aktivite gösterdiğini buldular. Özellikle altı ayın altındaki fetüs ve bebeklerde üzücü olan bir durum da kan beyin bariyerinin tam olarak gelişmemesidir.

Swaroop vd., (2011) yapmış oldukları çalışmada sentetik gıda boyalarının (Eritrozin, Tartrazin, Ponceau 4R, Sunset Yellow FCF, Brilliant Blue FCF, Fast Green FCF, Karmozin, Indigo Karmin) insan lenfositlerinde sitokinez bloklama mikronukleus (CBMN= Cytokinesis Block Micronucleus) tekniği ile genotoksik etkisini araştırmayı amaçlamışlardır. Sentetik boya içeren grupların kontrol grubuna nazaran genotoksik olduğu saptanmış ve gıda boyası kullanımında ADI (Acceptable Daily Intake=Kabul Edilebilir Günlük Alım Miktarı) değerinin baz alınmasının altı çizilmiştir.

Swaroop vd., (2011) renk maddelerinin tek başına, farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda genotoksisitesini Cytokinesis Block Micronucleus (CBMN) testini kullanarak açıklamışlardır. Çalışmada kullanılan tüm renklendiriciler ve kombinasyonları insan lenfositleri üzerinde genotoksisiteye neden olmuştur. Sunset Yellow ve Brilliant Blue'nun artan konsantrasyonlarında da aynı sonuçlar elde edilmiştir. Mitotik indeks ve mikronükleus çalışmaları istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Sonuçlar Hindistan'da katkı boyalarının 100 ppm konsantrasyona kadar kullanılabilirliğine izin vermiştir. Gıda boyalarının konsantrasyonları izin verilen değerin en az % 50 sinin altına düştüğünde toksisiteyi de azalmaktadır. Hatta izin verilen sınırlarda dahi sentetik gıda renklendiricilerinin dikkatli kullanılması gerekir.

Gao vd., (2011) tartrazin özütünün aktif davranış yanıtını, Morris su labirenti testinde kaçışta gecikmeyi artırdığını, adım testlerinde tutmada geciktirmeyi azalttığını gösterdiler. Tartrazin uygulanan ratların beyinde katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-PX) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde artış, malonaldehit düzeyinde artış görüldü. Bu değişiklikler beyin oksidatif hasarıyla ilişkiliydi. Bu çalışmadaki tartrazin doz düzeyleri nedeniyle hayvanlarda öğrenme ve bellek fonksiyonlarında birkaç yan etki oluştu. Bu mekanizmalar artmış lipid peroksidasyon ürünleri ve reaktif oksijen türleri, inhibe edilmiş endojen antioksidan savunma enzimleri ve beyin dokusunun hasarlanması ile ilişkili olabilir.

Karslı-Çeppioğlu ve Yurdun, (2012) İndigo ve indigoid boyaların sitotoksik etkisi, tripan mavisi yöntemi ile incelendi. Bu çalışmanın sonucuna göre boyalarının doza bağlı olarak DNA göçünü artırdığı görüldü. İndigotin ve 6-bromo indigotin'in 50 µg/ml'lik konsantrasyonu ile inkübe edilen hücrelerde DNA hasarı artmıştır ($p<0.05$). Sonuçlara göre, indigo ve indigoid boyaların yüksek konsantrasyonda genotoksik etkiye yol açabileceği ileri sürülebilir. Sonuç olarak, boyarmaddeler ile çalışan bireylerde yüksek konsantrasyonda boyaların genotoksik etkiye yol açabileceği göz önünde tutulmalıdır.

Kuş ve Halil Erhan, (2014) gıda katkı maddelerinin lenfosit hücre kültürleri üzerinde genotoksik ve sitotoksik aktivitelerini mitotik ve replikasyon indeksi, mikronükleus testi kullanarak araştırdılar. Mitotik indeks sıklığı ve replikasyon indeks değerini

azalmış ve mikronükleus sıklığını ise artmış olarak tespit etmişler ve Sunset Yellow ve Brilliant Blue gıda katkılarının sitotoksik ve genotoksik potansiyele sahip olabileceği sonucuna varmışlardır.

BÖLÜM 3

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Mikrobiyolojik Çalışmalar

3.1.1. Kullanılan Malzemeler:

1. Bu çalışmada Gaziantep Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji laboratuvarı stoklarından temin edilen *E. coli* bakterisinin ATCC 10799 suşu kullanılmıştır.
2. İki tür gıda boyası Brilliant Blue (Marke; KRK GIDA, Kod GR203, Ülke; İstanbul) ve Dark Green (Marke; KRK GIDA, Kod; GR203, Ülke; İstanbul).
3. Plate Count Agar (Marke; KGaA, Kod; 75963, Ülke; Germany).
4. Eosin Methylene Blue katı besiyeri. (Marka; OXID, Cod; CM0096; Ülke; England).
5. Serum fizyolojik sıvısı. (PH 6,5-7,5. Medical Distributing Cenetr).
6. Nutrient Broth sıvı besiyeri. (Marke: OXID, Cod: CM0001, Ülke; England).
7. İnkübatör (Marke; Memmet, Ülke; USA,
8. Çalkalamalı İnkübatör
9. McFarland cihazı ve tüpleri.
10. Plastik öze.
11. Tek kullanımlık petri kapları.
12. Vorteks cihazı

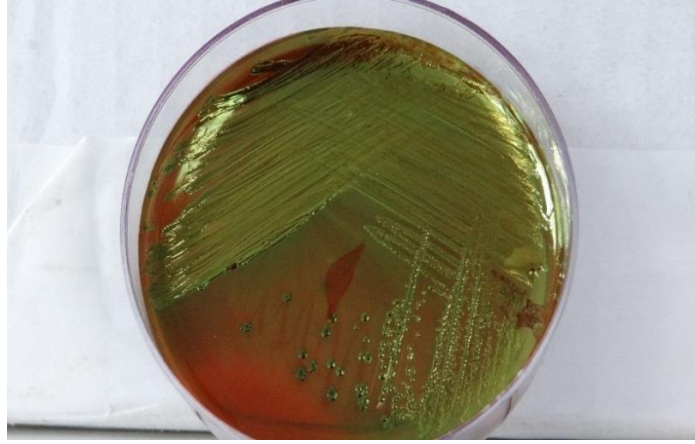


Şekil 3.1: a. McFarland cihazı b. Vorteks cihazı c. Çalkalamalı İnkübatör

3.1.2. METOD;

3.1.2.1. Bakteri Suşlarının Hazırlanması;

-20 °C' de saklanan bakteri stoklarının oda sıcaklığında erimesi sağlandı. Eriyen stoktan belli bir miktar alınarak EMB (Eosin Methylene Blue) katı besiyerine ekim yapıp 24 saat 37 °C de inkübe edildi. Böylece bakteri canlandırma işlemi gerçekleştirildi. Canlandırılan bakteri örneğinden sürüntü şeklinde alınarak serum fizyolojik sıvısı içinde çözünmesi sağlandı. Daha sonra McFarland cihazıyla 0, 34 değeri ölçüldü.



Şekil 3.2: Bakteri Canlandırma

McFarland standartıyla mikroorganizma hücrelerinin görsel konsantrasyonu yaklaşık olarak tayin edilir. McFarland ölçeği *E. coli* gibi gram negative bakterilerin konsantrasyonlarını tayin etmek için tasarlanmıştır

3.1.2.2. Gıda Boyaları Solüsyonlarının Hazırlanması:

10 ml serum fizyolojik sıvısına 500 mg gıda boyası eklenerek gıda boyası solüsyonları hazırlandı. Bu çalışmada, kontrol grubu (Nutrient broth sıvı besiyeri +bakteri) ve iki gıda boyası (Brillant Blue ve Daark Green) örnekleri hazırlandı.

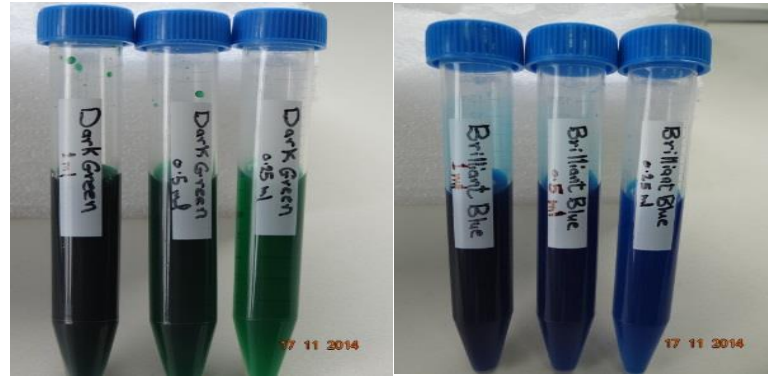
Tablo 3.1: Gıda Boyaları Solüsyonlarının Hazırlanması

Kullanılan Gıda Boyaları	Konstrasyon
E133 Brilliant Blue CI 42090	50 mg / ml
Dark Green CI 19140+CI 73015	50 mg / ml

Nutrient Broth’la seyreltilerek 5 mg/ml, 2, 5 mg/ml ve 1, 25 mg/ml şeklinde 3 farklı konsantrasyon oluşturuldu. Kontrol grubu ve boya örneklerine 1 ml 0, 34 McFarland değerinde *E. coli* ATCC 10799 bakteri suşundan eklendi.

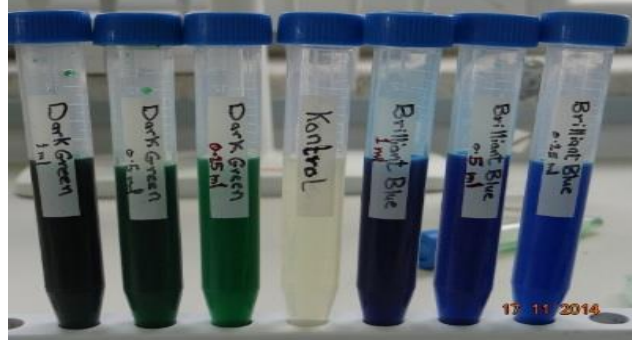
Tablo 3.2: Hazırlanan Ortamlardaki Konsantrasyonlar:

KullanılanGıda Boyaları	1.kons. (mg/ml)	2.kons.(mg/ml)	3.kons.(mg/ml)
E133 Brilliant Blue CI 42090	5	2.5	1.25
Dark Green CI 19140 + CI 73015	5	2.5	1.25



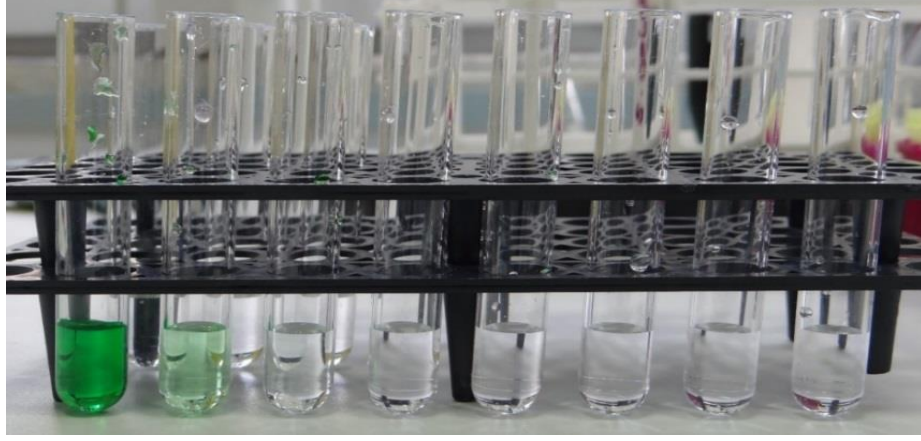
Şekil 3.3: Gıda boyalarının Konsantrasyonları

Her gün bir önceki günden örnek alınıp yeni solüsyona eklenerek 1 gece çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildi. Bu şekilde 20 nesil oluşturuldu.

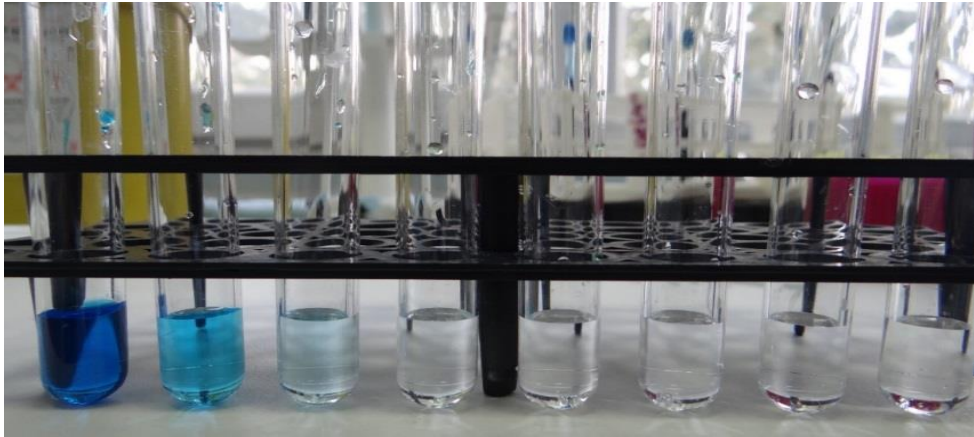


Şekil 3.4: Gıda boyaları ve Kontrol konstrasyonları

Her gün inkübe edilen örnekten alınıp serum fizyolojik sıvısıyla seyreltilerek 10^{-8} - 10^{-5} aralığında oluşturulan 3 farklı konsantrasyondaki örnekler PCA katı besiyerine ekildi. 24 saat boyunca 37°C de inkübe edilen bakteri kolonileri sayıldı.



Şekil 3.5: Dark Green'in seyreltilmesi



Şekil 3.6: Brilliant Blue nin seyreltilmesi



Şekil 3.7: *E. coli*'nin PCA katı besiyerinde çoğalması

3.2. Moleküler Çalışmaları

3.2.1. Kullanılan Malzemeler:

1. Ethanol $\geq 99.8\%$ (Marka; Sigma, Ülke; Germany).
2. Nutrient Broth (Marka; OXOID, Kod CM0001, Ülke; England).
3. Real time PCR Nano[®] (Marka; Roche, Biotch comp. Ülke; Japan.)
4. Sodium dodecyl sulfate (Marka; MICROPELLETS)
5. Chloroform (Marka; KGaA, Kod; K28142231, Ülke; Germany)
6. Phenol (AMRCESCO, Kod; 0945-1, Ülke; USA)
7. Tris Hcl ultra püre(Marka; MP, Kod; 816124, Ülke; France)
8. EDTA(SIGMA-ALDICH, Kod; 100108582, Ülke; USA)
9. Proteinase K.

3.2.2. Metod

3.2.2.1. *E. Coli* RNA İzolasyonu için High Pure PCR RNA Kit (Roche, Germany, Cat. No.11 828 665 001) Kullanıldı.

Çalışmaya Başlamadan Önce;

DNase I, 550µl Elution Buffer konularak bu çözülür. Bu solüsyon küçük parçalar ayrılarak ependroflara ayrılır ve $-15/-25^{\circ}\text{C}$ ' de saklanır. Yeterli miktar dışarı çıkarılarak çözülür.

Wash Buffer I, 20ml saf etanol, inhibitor removal buffer şişesine konularak hafifçe karıştırılır. Böylece solüsyon hazır hale gelir.

Wash Buffer II, 40ml saf etanol, wash buffer şişesine kolunlarak hafifçe karıştırılır. Böylece solüsyon hazır hale gelir.

1. Ekstaksiyon yapılacak numune sayısında 1,5 ml'lik ependrof tüpleri ayarlanır.
2. Tüplerin kapakları tek tek açılarak uygun tüplere 200 µl numune pellet ve tüm tüplere 400µl Lysis binding buffer ilave edilir.
3. Vorteks sonrası 37 °C 'da dakika inkübe edilir.
4. Vorteks yapılır ve ependrofdaki tüm miktar daha öncesinde ayarladığımız koleksiyon tüp içindeki High püre filtre ihtiva eden kolonların içine eklenir.
5. 1 dakika 8000x g' de santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında kolonun altındaki koleksiyon tüpü dökülür ve tekrar takılarak işleme devam edilir.
6. 90 µl Dnase incubation buffer + 10 µl Dnase I numune sayısı kadar bir tüpte ayarlanır.
7. Kolonların kapakları tek tek açılarak bir üst basamakta hazırladığımız Dnase çalışma buffer' ından 100 µl ilave edilir.
8. 15 dakika oda ısısında inkübe edilir.
9. 500 µl wash buffer I tüplerin kapakları tek tek açılarak ilave edilir.
10. 1 dakika 8000 x g' de santrifüj edilir. Santrifüj sonrası kolonun altındaki koleksiyon tüpü dökülür ve tekrar takılarak işleme devam edilir.
11. 500 µl wash buffer II tüplerin kapakları tek tek açılarak ilave edilir.
12. 1 dakika 8000x g' de santrifüj edilir. Santrifüj sonrası kolonun altındaki koleksiyon tüpü dökülür ve tekrar takılarak işleme devam edilir.
13. 200µl wash buffer II tüplerin kapakları tek tek açılarak ilave edilir.
14. 2 dakika 13000x g ' de santrifüj edilir. Santrifüj sonrası kolonun altındaki kolleklasyon tüpü atılır ve kolon 1,5ml' lik steril ependrof tüplerin için konulur.
15. Elüsyon buffer' dan 100µl tüm tüplerin kapakları tek tek açılarak ilave edilir.
16. 1 dakika 8000x g' de santrifüj edilir. Santrifüj sonrası ependrof içindeki kolon atılır.

RNA elde edilmiştir. Elüe edilmiş RNA -15/ -25 °C' de saklanır.

Aşama c DNA SENTEZİ

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* kullanılır.

50 reaksiyonluk Kat. No: 04379012001.

100 reaksiyonluk Kat. No: 04896866001

200 reaksiyon Kat. No: 04897030001.

***-15/-20 °C' de saklanır**

Sürekli dondur çöz yapılmamalıdır.

cDNA Çalışması

1. Termal cyclers açılır. 65 °C ' ye ısıtılır.
2. 1.2.3.4.5.6.9 numaralı tüpler Cooling Block üzerinde çözülür.
3. Çözülen tüpler kısa süreli santerifüj/ spin edilir. Tekrar Cooling Block üzerine dizilir.
4. Numune sayısı kadar 0,2'lik PCR tüp çıkarılır, Cooling Block üzerine dizilir.
5. Ayrı bir 0,5'lik tüp içinde aşağıdaki gibi hazırlık yapılır.

1 Numune için;

Oligo dT(Şişe 5) 1µl x (toplam numune sayısı +1)

Random Hexamar Primer(Şişe6) 1µl x(toplam numune sayısı +1)

Water (Şişe 7) 1µl x(toplam numune sayısı +1)

6. Hazırlanan bu miksten numuneler için işaretlenmiş 0,2'lik tüplere 3 µl dağıtılır.
7. Her bir tüpe 10 µl Total RNA numunelerinden eklenilir.
8. 65°C' de 10 dakika Thermal Cycler' de çalışılır. (c DNA1 Protokolü).
9. Thermal Cycler'den alınan tüpler vakit kaybetmeden Cooling Block üzerine dizilir.
10. RT miksi aşağıdaki sıraya göre yeni bir 0,5'lik tüp içinde hazırlanır:

Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (2şişe)	4µl
Protector RNase INhibstor (3şişe)	5µl
Deoxynucleotide Mix (şişe 4)	2µl
Transcriptor Reverse Transcriptase (şişe 1)	0,5µl

Not: Miktarlar 1 numune için verilmiştir. Toplam numune sayısı + 1 düşünülerek mik hazırlanmalıdır.

11. Numunelerin üzerine hazırlanan yukarıdaki miksten 7 µl pipetlenir ve pipetaj yapılır. (**kesinlikle vortekslenmez**).

12. Tüpler kısa süreli spin/ santrifüj edilir.

13. Aşağıdaki termal profilde çalışılır (cDNA2 Protokolü)

10 dakika 25 °C.

60 dakika 55 °C.

5 dakika 85 0C.

14. Thermal Cycler'den çıkarılan tüpler vakit kaybetmeden Cooling Block üzerine dizilir. 80 µl distile su ilave edilecek.

15. Elde edilen cDNA Light Cycler'da hemen çalışılmayacaksa -20 °C de muhafaza edilmelidir.

Real Time PCR: Light Cycler Master.

Carousel- Based System using Hydrolysis Teq Man® Probes. (Roche, Germany).

Not: çalışmada *lacZ* geni ekspresyonu için primer hazırlandı. Oligo adı sol; **TTT CCA TAT GGG GAT TGG TG**, sağ; **CTG GAA TTC CGC CGA TA T** dizilerinden primerler hazırlanıp Roche Light Cycler Taqman Master Real Time PCR protokolü uygulandı.

1. İlk olarak PCR mix hazırlandı: (Roche LightCycler Taqman Master kitinden çalışma gerçekleştirildi.)

Tablo 3.3: Hazırlanan PCR mix.

PCR bileşeni	Miktar (her bir örnek için)
Distile su	9 µl
Primers/probe	2 µl
Master mix	4 µl

2. PCR tüplerine 15 µl PCR mix'den eklendi, üzerine 5 µl örnek konuldu.

3. Light Cycler PCR cihazında program ayarlanıp çalışma başlatıldı.

4. Cihazın çalışma aşamaları

İnkübasyon için; 95 °C 10 dakika

Denatürasyon için; 95 °C 10 saniye

Annealing için; 20 °C 40 saniye

Uzatma için; 72 °C 1 saniye

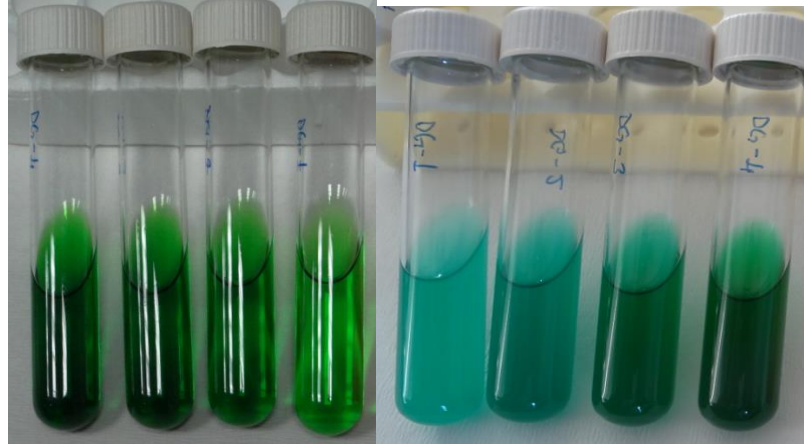
Soğutma için; 40 °C 30 saniye

Bu süreçlerde gerçekleşti.

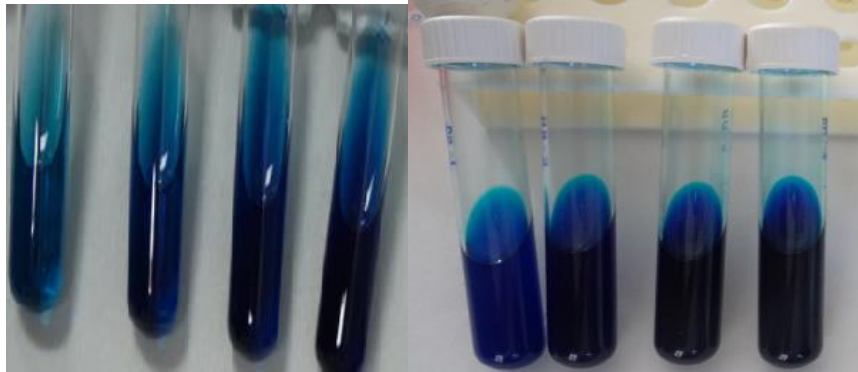
BÖLÜM 4

4. BULGULAR

Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda 2 gıda boyasının (Dark Green, Brilliant Blue) bağırsak mikro florasının bir üyesi olan *E. coli*'nin gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Dark Green, ve Brilliant Blue dozlarının konsantrasyon arttıkça *E. coli*'nin üremesinin de engellendiği görülmüştür.



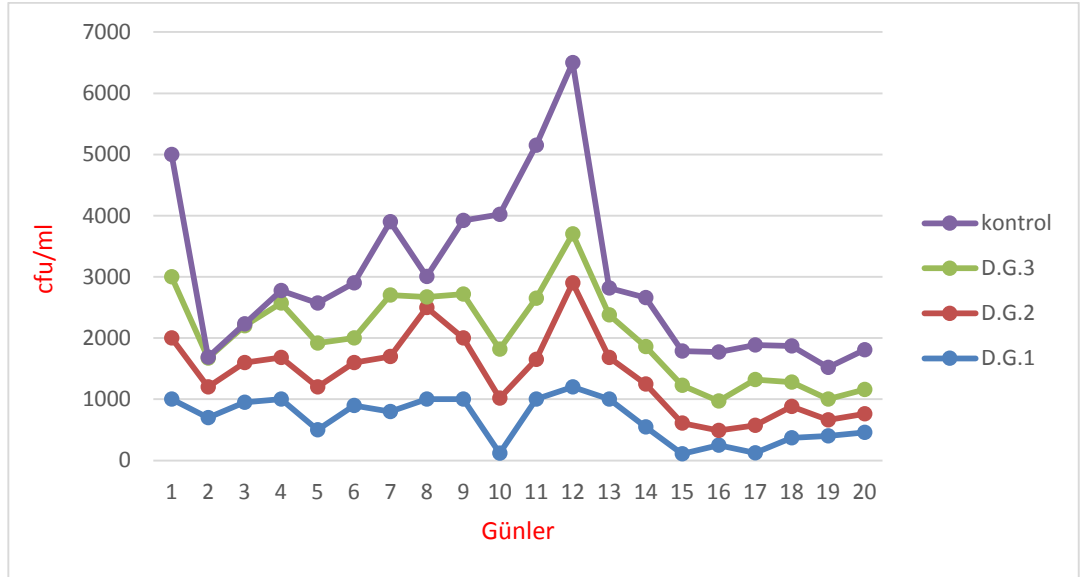
Şekil 4.1: *E. coli* inokülasyonundan Dark Green ile 24 saat sonraki görünüm



Şekil 4.2: *E. coli* inokülasyonundan Brilliant Blue ile 24 saat sonraki görünüm

Bu çalışmada kullanılan iki gıda boyası Dark Green ve Brilliant Blue' nun *E. Coli* ATCC 10799 suşunun 20 nesil boyunca üremesine olası etkileri araştırılmıştır. Her bir boyadan 500 mg miktarda tartılarak 10 ml distile suda çözülmüştür. 3 farklı konsantrasyon oluşturularak artan dozda gıda boyasının etkisi araştırılmıştır. Artan doza bağlı olarak Dark Green ve Brilliant Blue' nun *E. coli* üremesini engellediği görülmüştür. Kullanılan gıda boyalarının *E. coli* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi sıralanacak olursa Dark Green > Brilliant Blue şeklinde bir sıralama yapılabilir.

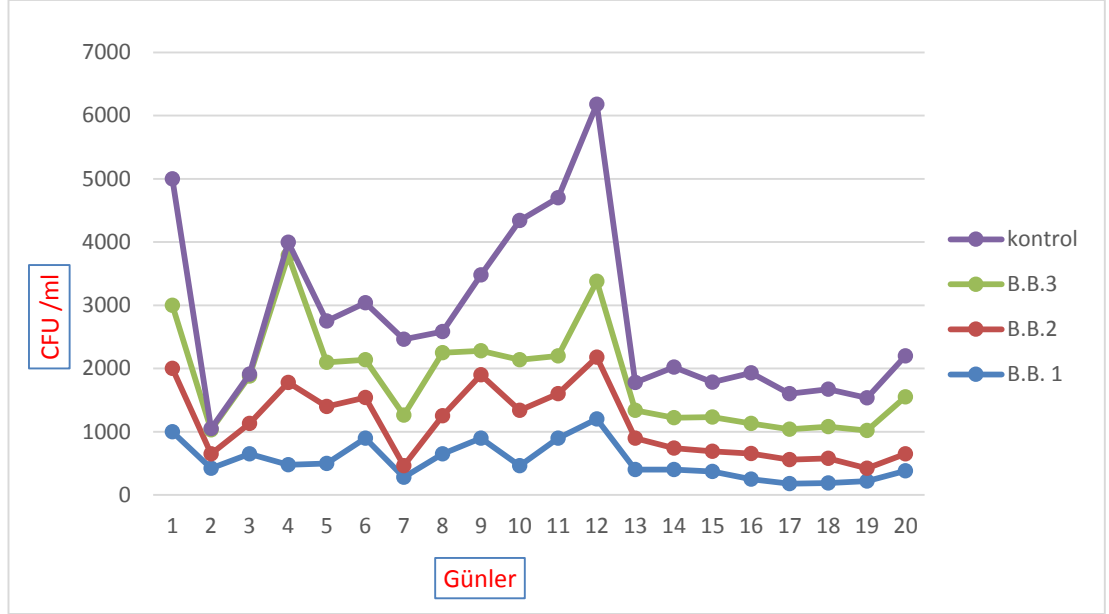
Dark Green gıda boyasının 20 Gün boyunca *E. coli* bakterisinin üremesine etkisi:



Şekil 4.3: *E. coli* ATCC 10799 suşunun Dark Green gıda boyasında inokülasyonundan 24 saat sonraki görünüm

Şekil (4,1)'e bakıldığında 1. günden 20. güne 3 dozda da bakteri üremesinde genel bir azalma gözlenmiştir. 1. günden 12. Güne kadar bakteri koloni sayısında dalgalanmalar mevcut iken 12. Günden itibaren stabil bir azalma mevcuttur. En az üreme miktarının grafikte D.G.1 (boya konsantrasyonunun en yoğun olduğu) eğrisinde olduğunu görmekteyiz. Aynı şekilde en fazla üremenin D.G.3 (boya konsantrasyonunun en az olduğu) eğrisinde olduğu görülür. Bu bilgiler doğrultusunda Dark Green gıda boyasının konsantrasyonun arttıkça *E. coli* bakterisinin üremesinin azalmasına sebep olduğu görülmüştür.

Brillant Blue gıda boyasının 20 Gün boyunca *E. coli* bakterisinin üremesine etkisi:

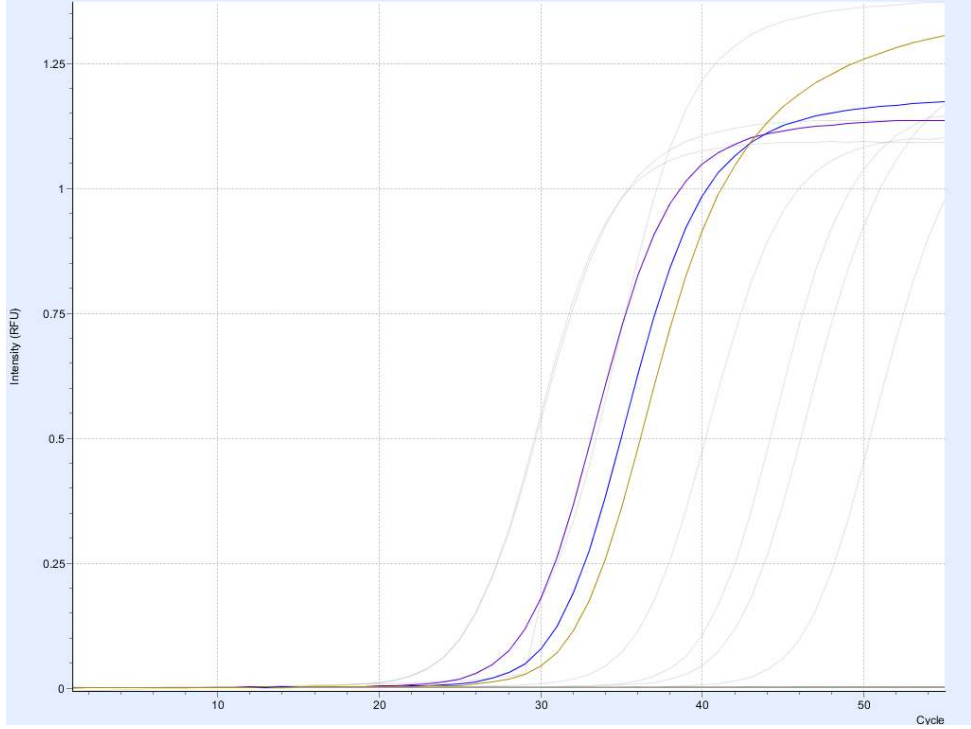


Şekil 4.4: *E. coli* ATCC 10799 suşunun Brilliant Blue gıda boyasında inokülasyonundan 24 saat sonraki görünüm

Şekil (4,2) 'ye bakıldığında 1. günden 20. güne 3 dozda da bakteri üremesinde genel bir azalma gözlenmiştir. 1. günden 12. Güne kadar bakteri koloni sayısında dalgalanmalar mevcut iken 12. Günden itibaren stabil bir azalma mevcuttur. En az üreme miktarının grafikte B.B.1 (boya konsantrasyonunun en yoğun olduğu) eğrisinde olduğunu görmekteyiz. Aynı şekilde en fazla üremenin B.B.3 (boya konsantrasyonunun en az olduğu) eğrisinde olduğu görülür. Bu bilgiler doğrultusunda Brilliant Blue gıda boyasının konsantrasyonun arttıkça *E. coli* bakterisinin üremesinin azalmasına sebep olduğu görülmüştür.

E. coli üremesini engelleyen gıda boyaları konsantrasyonlarına göre; Dark green, Brilliant blue uygulanan ortamların tüm konsantrasyonlarda azalma olması bunları içeren gıdaların tüketilmesinin bu bakteri üzerine ve florayı oluşturan diğer türler üzerine etkili olabileceğini göstermektedir.

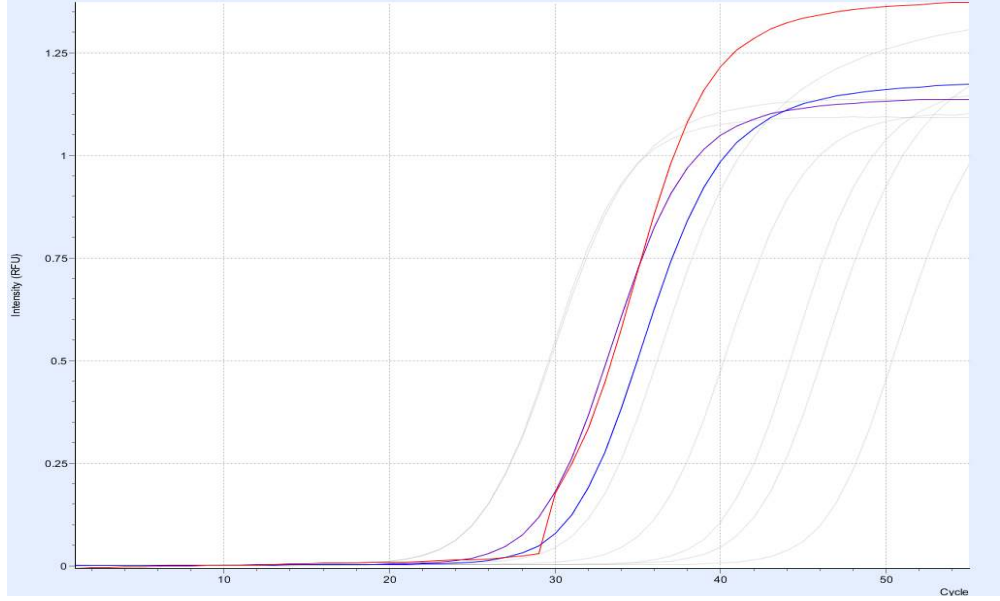
Dark Green Gıda Boyasının Real Time PCR Sonucunda Amplifikasyon Eğrileri



Şekil 4.5: Dark Green gıda boyasının Real Time PCR sonucu

Dark Green 1. Jenerasyon (sarı renkli eğri), Dark Green 20. Jenerasyon (mavi renkli eğri), kontrol jenerasyon (mor renkli eğri). Şekil 4.5' e bakıldığında kontrol ve Dark Green gıda boyasına maruz bırakılmış jenerasyon amplifikasyon eğrilerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Brilliant Blue Gıda Boyasının Real Time PCR Sonucunda Amplifikasyon Eğrileri



Şekil 4.6: Brilliant Blue gıda boyasının Real Time PCR sonucu

Brilliant Blue 1. Jenerasyon (kırmızı renkli eğri), Brilliant Blue 20. Jenerasyon (mavi renkli eğri), kontrol jenerasyon (mor renkli eğri)

Şekil 4.5' e bakıldığında kontrol ve Brilliant Blue gıda boyasına maruz bırakılmış jenerasyon amplifikasyon eğrilerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır.

BÖLÜM 5

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Gıda boyaları günlük hayatımızda yaygın olarak kullanılmaktadır. 1950 yılına kadar insanlarda herhangi bir toksik etki fark edilmemesi nedeniyle gıdalarda kullanılan boya maddelerinin güvenliği üzerinde önemle durulmamıştır. Ancak bu tarihten sonra bazı toksik etkilerinin gözlenmesi ile gıda boyalarının zararlı etkileri üzerine ilgi artmış, Gıda ve İlaç Teşkilatı (FDA) toksikoloji laboratuvarlarında önemli ölçüde kronik toksisite testleri uygulanmaya başlamıştır (Safeway 1987). Birçok ülke farklı gıda boyalarına yasaklamalar getirmiş, izin verilen boyalara da sınırlamalar getirmişlerdir. Gıdalarda kullanılmasına izin verilen boya maddelerinin sayısı ve çeşidi ülkelere göre değişmektedir. Örneğin İskandinav ülkelerinden Norveç, 1978’de; İsveç ise 1980’de her türlü sertifikalı (sentetik) boyanın gıda maddelerine katılımını tamamen yasaklamıştır. Avusturya, 8’i sentetik olmak üzere toplam 27 boyaya müsaade etmektedir (Yaman, 1996, Karaali ve Özçelik, 1993, Ekşi, 1996). Ülkemizde yürürlükte olan, Tarım ve Köy işleri Bakanlığı’nın 2002 yılında yayımladığı “Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliği” ile bu maddelerin gıdalarda kullanım miktarları belirtilmiştir.

Yapılan bir araştırmada yaşları 16-73 arasında olan 81 hastanın % 44,4’ünde bağırsak rahatsızlığı tespit edilmiştir. Bu hastaların % 25’i diyet (boyasız ve koruyucusuz gıdalarla) uygulayarak bağırsak rahatsızlıkları düzeltilebilmiş, geri kalanlarda ise ilaçla tedaviye ihtiyaç duyulmuştur (Antico, 1989).

İndigotin’in domuzlar, köpekler, tavşanlar, fareler ve insanlar üzerindeki uzun ve kısa süreli çalışmalarında kanserojenik, mutajenik ve teratojenik olmadığı tespit edilmiştir (Sudhic ve Khanna 1991).

Aromatik azo yapısındaki gıda boyaları bağırsakta asit, sindirim enzimleri ve bağırsak florasının etkisi altında kalarak redüktif parçalanmaya uğramakta ve aromatik aminler oluşmaktadır (Chung 1992). Oluşan aminler absorbe edilerek metabolize olmak, mutajenik ve promutajenik metabolitler meydana gelmektedir (Liener 1969).

Bu çalışmada kullanılan iki gıda boyası Dark Green ve Brilliant Blue' nun *E. Coli* ATCC 10799 suşunun 20 nesil boyunca üremesine olası etkileri araştırılmıştır. 1. günden 20. güne 3 dozda da bakteri üremesinde genel bir azalma gözlenmiştir. 1. günden 12. Güne kadar bakteri koloni sayısında dalgalanmalar mevcut iken 12. günden itibaren stabil bir azalma mevcuttur. Bu fenotipik azalmanın sebebinin genotipik kaynaklı olup olmadığı çalışılmıştır. Bu amaçla imkanlar doğrultusunda bakteriyel gelişiminde en çok etkili genlerden biri olan lacZ geninde genotipik bir değişiklik olup oluşmadığına bakıldı. LacZ geni açısından genotipik bir değişiklik oluşmadığı görüldü. Ancak bakteri gelişiminde etkili olan rpoB, lacA, lacy gibi gen bölgelerine de bakılabilir.

Hatta tüm genom sekanslaması yapılarak gıda boyalarının bakteri gelişiminde inhibisyona neden olan genotipik değişimler tespit edilebilir. Ancak çalışmamızda mevcut koşullar doğrultusunda sadece LacZ geni açısından araştırılmıştır.

İnsanın simbiyotik ilişki içinde yaşadığı mikroorganizmaların gelişimlerinin teşviki ve önlenmesi gibi etkiler de insan sağlığını dolaylı olarak etkilemektedir. Bu nedenle bağırsak mikroflorasının gelişimini önlemeyecek dozda gıda boyası kullanımı tercih edilmelidir. Gıda boyalarının insan sağlığına zararsız dozlarda kullanımı gıda güvenliği açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

- Altuğ, T. (2001).Gıda Katkı Maddeleri. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü. İzmir.
- Adams, E.J. (1992). Nutritional Care in Food Allergy and Food Intolerance. Mohan, L.K., Arlin M. (Ed): Food Nutrition and Food Therapy. WB Saunders Company. Philadelphia.
- Aksoy, M. (1984). Beslenme ve Kanser. Hacettepe Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik 26.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D. and Aitio, A. (2000). IPCS Guidelines for the Monitoring of Genotoxic Effects of Carcinogens in Humans. *Mutat. Res.*, 463:111-172.
- Anderson, D. (1988). Human Biomonitoring. *Mutat. Res.*, 204:353-541.
- Baron, S. (1996). Medical Microbiology. 4th ed. University of Texas Medical Branch at Galveston. Texas.
- Basim, M. (2004). Gıda Katkı Maddeleri ve Gıda Kontrolü. Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi (STED). Cilt 13, Sayı, 3: 86-88.
- Baysal, A. (1990). Beslenme 5. Baskı. Hacettepe Üniversitesi yayın. No: A/61:289.
- Beaugerie, L. and Petit, J.C. (2004). Antibiotic-associated diarrhea. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, vol.18, 337-352.
- Bernan, A., Daivedson, P., Salminen, S. and Juhn, H. (2001). Food Additive, 2nd. New York. Basel.
- Bonassi, S., Znaor, A., Norppa, H. and Hagmar, L. (2004). Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. *Cytogenet. Genome Res.*104:376-382.
- Boyacıoğlu, D. (2011). Gıda katkı maddeleri, Panel III, Klinik toksikoloji derneği 16. Kongresi Özet Kitabı.18-21 Mayıs, Kayseri.
- Bozkırlı, O. (2007). Aspir Çiğeginden (*Carthamus tinctorius*) Süperkritik Karbondioksit Ekstraksiyonu İle Doğal Boya Eldes Ve Uygulanabilirliği, Gazi Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü. Ankara.

- Briggs, D., (1997). Food additives. p. 601-602, In: "Food and Nutrition" Eds. Wahlqvist ML. Allen & Unwin Pty Ltd. Australia, p. 624.
- Brown, J.E. (1997). Nutrition Now. *West Publishing*. St. Paul.
- Burrows, A. (2009). Palette of Our Palates: A Brief History of Food Coloring and Its Regulation. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*. Vol.8.pp. 394-408.
- Carrano, A.V. and Natarajan, A.T. (1988). Consideration for Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques. *Mutat. Res.*, 204:379-406.
- Caucino, J.A., Armenaka, M., Rosenstreich, D.L. (1994). Anaphylaxis associated with a change in premarin dye. *Formulation. Ann. Allergy*. 72: (1). 33-35.
- Chaudhury, A., Nath, G., Tikoo, A. and Sanyal, SC. (1999). Enteropathogenicity and antimicrobial susceptibility of new *Escherichia* spp. *Journal Diarrhoeal Dis Res* 17 (2): 85-7.
- Chengalroyen, M. and Dabbs, E. (2013). The microbial degradation of azo dyes: minireview, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol.29, 389-399.
- Chung, K.T. (1983). The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 114(3): 269–281.
- Chung, K.T. Stevens, S.E.J.R. and Cerniglia, C.E. (1992). The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Crit. Rev. Microbiol.* 18. (3). 175-190.
- Clifford, R.J., Milillo, Prestwood, J., Quintero, R., Zurawski, D.V., Kwak, U.I., Waterman, P.E., Lesho, E.P. and McGann, P. (2012). Detection of Bacterial 16S rRNA and Identification of Four Clinically Important Bacteria by Real-Time PCR.*doi: 10.1371/journal.pone.0048558*, 7(11).
- Collins, C. (1992). Food Science and Nutrition Professor, Extension Specialist. Department of Food Science and Human Nutrition. Colorado State University, Room 200-B.
- Collins, P. & Stich, E. (1998). Black carrots: established raw materials for the manufacture of Carantho1 food color and Exberry1 vegetable juice colors (stability application). Department of Food Science and Human Nutrition. Colorado State University.
- Çelik, R. (2013). 4-Metilimidazol'un İnsan Periferik Lenfositlerinde In Vitro Genotoksik Etkileri. Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi.

- Çiftçi, U. (2011). Klinik Mikrobiyolojide son yıllarda neler var! Mikroflora.dirençli bakteriler, yeni teknolojiler. Düzen Laboatuvarlar Grubu.
- Das, A. and Mukherjee, A. (2004). Genotoxicity Testing of the Food Colours Amaranth and Tartrazine. *Int Journal Hum Genet*, 4(4): 277-280.
- Demirer, M.A. (1974). Sekerlerdeki boyaların ince tabaka kromatografisi ile tanımlanmaları üzerine araştırmalar. A.Ü. Vet. Fak. Der. 21: 145-150.
- Devlin, J. and David T.J. (1992). Tartrazine in atopic eczema. *Arch. Dis. Childhood*.67: 709-711.
- Downham, A. and Collins, P. (2000). Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science and Technology*.35, 5(22).
- Ekinci, N. (2011). Muhtelif Gıda Boyalarının Pisum Sativum L. Üzerine Genotoksik Etkileri. Sakarya Ünversitesig Fen Bglgmlerig Enstgtüsü.Yüksek Lisans Tezi.
- El Ali, Bassam M. and Farehat Ali, M. (2005). Handbook of industrial chemistry. Pp 628. McGraw-Hil, New York.
- Ellis, E.F., Adkinson, N.F., Yunginser, J.W. and Busse, W.W. (1998). Allergy, principles and practice. 5 th. Mosby. Vol.2, pp. 1183-98.
- Erden, Z. and Çalışkan, D. (2003). Gıda Katkı Maddeleri Ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri, *J. Fac. Pharm, Ankara*, 32 (3) 193-206.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2010).Scientific Opinion on the re-evaluation of Brilliant Blue FCF (E 133) as a food additive. *EFSA Journal*, 8(11):1853.
- Fenech, M. (2002). Biomarkers of Genetic Damage for Cancer Epidemiology.*Toxicology*.181-182: 411-416.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2003). The State of Food Insecurity in the World (SOFI).5th. Ed. Viale delle Terme di Caracalla. Roma.
- Furia E.T. (1975). Color Additives in food. CRC Prss. Handbook. Of food additives 2.edition 589-603.
- Gao, Y., Li, C., Shen, J., Yin, H., An, X. and Jin H. (2011). Effect of food azo dye tartrazine on learning and memory functions in mice and rats, and the possible mechanisms involved. *Jou. Food Sci.*, 76(6),
- Gardner, F. and Malagelada, J.R. (2003). Gut flora in health and disease, *The Lancet*, vol.316, 512-519.

- Gherorghiev, G.K. (1987). The international regulation and control of food additives. *The first International symposium on food industry*. İzmir.
- Gibson, R.G. (2004). Fiber and effects of probiotics (the probiotic concept), *Clinical Nutrition Supplements*, vol. 1, 25-31.
- Gökmen, H. and Köksal, G. (2001). Bebek beslenmesinde yağ aşitlerinin önemi. *Beslenme ve Diyet Dergisi*. 301:35-44.
- Golberg, L. (1997). The toxicology of artifical coloring materials. *Cos. Chemists*. 18:421-432.
- Guarner, F., and Malagelada, R. (2003). Role of bacteria in experimental colitis, *Best Practice and Research Clinicl Gastroenterology*, 7 (15).
- Gupta, V.K., Mittal, A., Krishnan, L. and Mittal, J. (2006). Adsorption treatment and recovery of the hazardous dye Brilliant Blue FCF over bottom ash and de-oiled soya. *Journal of Colloid and nterface Science*. 293, 16-26.
- Gürcan, T. (1993). Gıda Maddelerinin Toksikolojik Açıdan Degerlendirilmesi. *Gıda Sanayii* 7(2): 29.
- Hagmer, L., Brøgger, A., Hansteen, I.L., Heim, S., Högstedt, B., Knudaen, L., Lambert, B., Linnainmaa, K., Mitelman, F., Nordenson, I., Reuterwall, C., Salomaa, S., Skerfving, S. and Sorsa, M. (1994). Cancer Risk in Human Predicted by Increased Levels of Chromosomal Aberrations in Lymphocytes: Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage. *Cancer Res.*, 54:2919-2922.
- Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, Ph. and MacGregor, J.T. (1991). Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present, and Future. *Environ. And Mol. Mutagen*.18:277-291.
- Henschler, D. and Wğld, D. (1985). Mutagenic activity in rat urine after feeding with the azodye Tartrazine. *Arch. Toxicol*. 57, 214-215.
- Henschler, D., Wild, D. (1986). Mutagenicity of tartrazine revisited *Arch. Toxicol*.59:69-70.
- Hess, S.M. and Fitzhugh, O.G. (1955). Absorption and excretion of certain triphenylmethane colors in rats and dogs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 114(1): 38-42.
- Hutchinson, A.P., Carrick B., Miller, K. and Nicklins, S. (1992). Adverse reactions to synthetic food colours interacions between tartrazine and muscarinic acetyl choline receptors. *In isolated quinea pig ileum*.Toxicol. Left. 60: 2. 165–173.

- İçöz, A., Demirkol, O. and Mehmetoğlu, A.Ç. (2008). Çeşitli Gıda Boyalarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Mts Testi Kullanılarak Belirlenmesi. Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü.33 (6): 275-279.
- İzbirak, A., Sümer, S. and Diril, N. (1990). Gıdalara Katılan Bazı Azo Boylarının Mutajenik Etkilerinin Test Edilmesi. *Mikrobiyol bült.* (24), 48_56.
- Karaali, A. and Özçelik, B. (1993). Gıda Katkısı Olarak Doğal ve Santetik Boyları. İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü.İstanbul.18, (6), 389-396.
- Karpliuk, I.A., Volkova, N.A., Okuneva, L.A., Gogol, A.T. and Rybakova, K.D. (1984). Mutagenic effect of the food-coloring agent's tartrazine and indigo carmine. (2):58-61.
- Karlı-Çeppioğlu, S. and Yurdun, T. (2012). In vitro testing for genotoxicity of indigoid dyes by comet assay. *Journal of Marmara University Institute of Health Sciences*, 2 (3), 108-112.
- Kettle, A.J., Clark, B.M. and Winterbourn, C.C. (2004). Superoxide converts indigo carmine to indigo sulfonic acid: implications for the hypothesis that neutrophils produce ozone. *J. Biol. Chemistry*.279 (18).
- Kirschbau, J., Krause, C., Pfalzgraf, S. and Brückner, H. (2003). *Development and evaluation of an HPLC-DAD method for determination of synthetic food colorants*. Chromatographia, Vol. 57, Sup. 1 / January, S115-119.
- Kobylewski, S. and Jacobson, M. (2010). Food Dyes A Rainbow of Risks. 3rd Ed. Center for Science in the Public Interest. Ottawa.
- Koşoğlu, H. and Yaman, K. (2011). Enterohemorajik *E.coli* ve 2011 Almanya Salgını (EHEC) Bakterisi.Acibadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.
- Kotsonis, F., Burdock G. and Flamm, W. (2001). Food toxicology, *Mc Graw Hill*, New York, p. 1049-1087.
- Kuş, E. and Eroğlu, H.E. (2014). Genotoxic and cytotoxic effects of sunset yellow and brilliant blue, colorant food additives, on human blood lymphocytes. *Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol.28, No.1, pp.227-230.
- Lau, K. and McLean, W.G. (2006). Synergistic interactions between commonly used food additives in a developmental neurotoxicity test. *Toxicological Sciences*. 90 (1): 178-187.

- Liener, E.I. (1996). Toxic constituents of plant food stuffs. *Food Sci. and Techn.* A Series monograph. 357–359.
- Lodish, H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S.L., Matsudair P. and Darnell, J. (1997). Molecular Cell Biology, 3ed. Ed. Scientific American Books, 407-411
- Malik, K., Tokkas, J. and Goyal, S. (2012). Microbial pigments: a review, *Int J Microbial Res. Technol*; 1(4): 361–5.
- Meggos, H. (1995). Food colors: an international perspective. *The Manufacturing Confectioner*. (59), 65.
- Mital, A. (2006). Use of hen feathers as potential adsorbent for the removal of a hazardous dye, Brilliant Blue FCF, from wastewater. *Journal of Hazardous Materials*. B128. 233–239.
- Murray, R.K., Mayes P.A., Granner, D.K., Rodwell V.W., Çevirenler: Menten Gülriz, Ersöz Biltan. (1993). Harper'in Biyokimyası, Baris Kitabevi, 117-118, 168-169, 508-511.
- Norppa, H. (2004). Cytogenetic Biomarkers and Genetic Polymorphism. *Toxicology Letters*. 149:309-334.
- Oben, Ö. (1999). Türkiye Kökenli Kırmızı Lahanadan Boyar Madde Eldesi Üzerine Bir Çalışma, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul,
- Oranusi, N.A. and Njoku, H.O. (2005). Biotransformation of Food Dyes by Human Intestinal Bacteria (*Streptococcus faecalis*, *Eschericia coli*). *Journal of Applied Sciences & Environmental Management*. 10(2):159-163.
- Öncül, Ö. (2009). Bazı Gıda Boyalarının Mutajenik Potansiyellerininames / Mikrozom Testi İle Araştırılması Ve B-Galaktozidaz Üzerine Etkileri. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- Öztürk, S., Erel, F., Zafer, A., Karaayvaz, M., Güleç, M. and Kartal, Ö. (2007). Kronik İdiopatik Ürtiker'de Katkı Maddeli Gıdalar ile Doğal Gıdalarda Bulunan Vazoaktif Maddelerin Rolü, *Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 6 (5), 351-356.
- Phillips, J.C., D. Mendis, C.T. Eason and Gangolli, S.D. (1980). The metabolic disposition of 14C-labelled Green S and Brilliant Blue FCF in the rat, mouse and guinea pig, *Food Cosmet. Toxically*. 18, 7-13.
- Pien, FD, Shrum, S., Swenson, JM., Hill, BC, Thornsberry, C. and Farmer, JJ. (1985). Colonization of human wounds by *Escherichia vulneris* and *Escherichia hermannii*. *J. Clin Microbiol*. 22 (2): 283-5.

- Pollastrng, M.T., Barea, M., Salas, J. (1990). Genotoxic study of commercial dyes with Tartrazine base in *S. typhimurium* his- and *E. coli* trp-. *Rev. Sanid. Hig. Publica. (Madr)*. 64, 203-209.
- Poula, M., Jarry, G., Elhkim, M.O., Poula, J.M. (2009). Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 47(2):443–448.
- Price, P.J., Suk, W.A., Freeman, A.E., Lane, W.T., Peters, R.L., Vernon, M.L. and Huebner, R.J. (2006). In vitro and in vivo indications of the carcinogenicity and toxicity of food dyes. *International Journal of Cancer*. 21(3): 361–367.
- Price, P.J., W.A. Suk, A.E. Freeman, W.T. Lane, R.L. Peters, M.L. Vernon and R.J. Huebner. (1978). In vitro and in vivo indications of the carcinogenicity and toxicity of food dyes. *Int. J. Cancer*, 21, 361-367.
- Reineccius, G. (1994). Source book of flavors. 2nd. Edition. An Aspin publication. Pp 88-816.
- Renwiek, A.G. (1995). The Use of an Additional Safety or Uncertainty Factor for Nature of Toxicity in the Estimation of Acceptable Daily ntake and Tolerable Daily ntake Values. *Regulatory Toxicotry and Pharmacology*. 22:250.
- Rizvi, S., Daniels, J., Benado, A. and Zollweg, J.A. (1986). Supercritical fluid extraction: operating principles and food applications, *Food Technology*, 6, 57-64.
- Ronald, A. and Saimon, MD. (2003). Adverse reactions to food additives. *Current Allergy and Asthma Reports*. Vol. 3, 62-66.
- Safeway, H.L. (1987). Additives why do we need them. *Issved by safeway Nut. Adv. Ser.* London.
- Safford, R.J. and Goodwin, B.F.J. (1985). Immunological studies on tartrazine and its metabolites. *Int Archs. Allergy appl. Immunol*, 77:331:336.
- Sarıkaya, R., Selvi, M., Akkaya, N., Acar, M. and Erkoç, F. (2010). Farklı Konsantrasyonlardaki Gıda Boyalarının *Drosophila melanogaster* (mwh x flr)'de Yaşama Yüzdesi Üzerine Etkisi. *Gazi Eğitim Fakültesi, İlköğretim Bölümü.Teknikokullar*, 06500, Ankara. 5 (1): 38-46.
- Savage, J.R.K. (1993). Update on Target Theory as Applied to Chromosomal Aberrations. *Env. and Mol. Mutagen*. 22:198-207.

- Schab, D. and N. Trinh (2004). "Do artificial food colors promote hyperactivity in children with hyperactive syndromes? A meta-analysis of double-blind placebo-controlled trials. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*. 25: 423-34.
- Sears, C. (2005). A dynamic partnership: Celebrating our gut flora, *Divisions of Infectious Diseases and Gastroenterology*, 247–251.
- Selemoğlu, A. and Yıldız, F. (1983). Kırmızı Pancardan Pigmentlerin İzolasyonu. *Dıda Yıl 8*, say.6, s.261-263.
- Singh, S., Das, M. and Khanna, S.K. (1997). Reductive and hydrolytic activities of enteric bacteria on food colours. *Indian J. Exp Biol.* 35(8):912-4.
- Siva, R., Palackan, M., Maimoon, M., Geetha, T. Balamurugan, P., Rajanarayanan, S. and Bhakta, D. (2011). Evaluation of antibacterial, antifungal, and antioxidant properties of some food dyes, *Food Science and Biotechnology* .vol.20, pp.7-13.
- Sudhıc, S. and Khanna S.K. (1991). Toxicological evaluation of permitted food colours. Part. IV Indigoid dye (blue) Ind. Dairy. 43:11.501-504.
- Swaroop, V.R, Roy, D.D., Vijayakumar, T. (2011). Genotoxicity of synthetic food colorants. *Journal of Food Science and Engineering*.1:128-134.
- Thomas, B. (1988). *Manual of Dietetic Practice*. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Thorley, G. (1984). Pilot study to assess behavioral and cognitive effects of artificial food colors in a group of retarded children. *Develop. Med. Child. Neurol.* 26: 56–61.
- Thorn Chung, S., Stevens, E. and Cerniglia, C.A. (1992). The Reduction of Azo Dyes by the Intestinal Microflora. *Microbiology Division, National Center for Toxicological Research*. 18, (3), 175-190.
- Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. (1997) .*T.C. Resmi Gazete*. Sayı: 23172: 1-220.
- Üstaçelebi S., Mutlu G.,İmir T., Cengiz A. T., Tümbay, E. and Mete, Ö. (1999). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi. 76-77.
- Venil, Ch., Zakaria, Z. and Ahmad, W. (2013). Bacterial pigments and their applications, *Scince Direct* .vol.48, 1065–1079.
- Weber, R.W. (1993). Food additives and allergy. *Journal Allergy Clin. Mmunol.* 70: 183-190.
- Yaman, M. (1996). Bazı Gıda Maddelerine Katılan Sentetik Boyaların Miktarlarının Araştırılması. Gazi Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Ankara.

Yentür, G., Ekşi, A. and Bayhan, A. (1996). Ankara piyasasından sağlanan pasta süsleri ve bazı şekerlerde sentetik boya miktarlarının araştırılması, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 43: 479-484.

Yücecan, S. (1999). Nşaat işçilerinin enerji harcamaları, beslenme ve sağlık durumları. Sağlık Teknolojisi Yüksek okulu Beslenme ve Diyetetik Bölümü. Ankara.

Yurttagül, M. ve Ayaz, A. (2008). Katkı Maddeleri, Yanlışlar ve Doğrular. Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü. Hacettepe Universities.