

Gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan sodyum benzoat ve potasyum sorbat karışımının genotoksik potansiyelinin mikronukleus testi ile belirlenmesi

Sevcan MAMUR¹, Nazmiye ATASEVEN², Fatma ÜNAL²,
Deniz YÜZBAŞIOĞLU^{2,*}

¹ Gazi Üniversitesi, Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi, Ankara

² Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara

Geliş Tarihi (Received Date): 05.02.2018

Kabul Tarihi (Accepted Date): 17.05.2018

Özet

Sodyum benzoat (SB) ve potasyum sorbat (PS), gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmada SB ve PS karışımının genotoksik potansiyeli insan lenfositlerinde mikronukleus (MN) testi ile değerlendirilmiştir. SB+PS karışımının dokuz farklı kombinasyonu (12.5 SB+125 PS ile 50 SB+500 PS µg/mL aralığında) kültüre alınmış insan lenfositlerine 48 saat uygulanmıştır. MN testi sonuçlarına göre; SB+PS karışımının uygulanan tüm konsantrasyonlarda mikronukleus frekansını kontrole kıyasla anlamlı düzeyde artırdığı belirlenmiştir. Buna karşın, SB+PS karışımının çalışılan konsantrasyonlarda hücre siklusu belirteci olan nükleer bölünme indeksini (NBI) anlamlı düzeyde etkilemediği tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, SB+PS karışımının in vitro koşullarda MN testi ile insan lenfositlerinde klastojenik ve/veya anöjenik etkileri olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Gıda koruyucusu, sodyum benzoat, potasyum sorbat, insan lenfositleri, mikronukleus, nükleer bölünme indeksi.

Sevcan MAMUR, smamur@gazi.edu.tr, <https://orcid.org/0000-0002-8615-5331>

Nazmiye ATASEVEN, nazozengin@hotmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4382-075X>

Fatma ÜNAL, funal@gazi.edu.tr, <https://orcid.org/0000-0002-7468-6186>

* Deniz YÜZBAŞIOĞLU, deniz@gazi.edu.tr, <https://orcid.org/0000-0003-2756-7712>

Determination of genotoxic potential of food preservative mixture of sodium benzoate and potassium sorbate by micronucleus test

Abstract

Sodium benzoate (SB) and potassium sorbate (PS) are widely used as preservative additive in food. The present study evaluates genotoxic potential of a mixture of SB and PS in cultured human lymphocytes by using micronucleus (MN) test. To assess genotoxic effect, human lymphocytes were treated with nine different combinations of SB+PS (between 12.5 SB+125 PS and 50 SB+500 PS µg/mL) for 48 h. MN test revealed that the mixture of SB+PS treatment significantly increased the MN frequency at all concentrations compared to vehicle control. On the contrary, the mixture of SB+PS did not significantly affect the nuclear division index (NDI) that is cell cycle biomarker. The results obtained show that the mixture of SB+PS probably induce clastogenic and/or aneugenic effects in human peripheral blood lymphocytes in vitro by MN test.

Keywords: Food preservative, sodium benzoate, potassium sorbate, human lymphocytes, micronucleus, nuclear division index.

1. Giriş

Gıda güvenliği, halk sağlığı açısından dünya çapında büyük önem taşıyan bir konudur. Son yıllarda gelişen teknolojiyle birlikte gıdalarda kimyasal maddelerin kullanımı her besin grubunda artış göstererek yaygınlaşmaya başlamıştır. Gıda katkı maddeleri “Ham madde hazırlık, imalat, paketlenme ve depolama gibi işlemler sırasında gıdaların bazı teknolojik ve organoleptik özelliklerini düzeltmek, iyileştirmek, biyolojik ve besleyici değeri korumak veya düzeltmek, bunun yanısıra gıdalarda meydana gelebilecek istenilmeyen değişiklikleri engellemek, ürünün kalite ve raf ömrünü artırmak amacı ile bilinçli olarak kullanılan doğal ve yapay kaynaklı madde veya madde karışımları” olarak tanımlanmıştır [1]. Söz konusu maddeler ksenobiyotik niteliğinde olup, tavsiye edilenden daha yüksek miktarlarda kullanıldıklarında toksik etkiye sebep olabilmektedirler [2]. Ayrıca koruyucu maddeler birbirleriyle reaksiyona girerek vücutta toksik maddeler üretebilmektedir [3].

Koruyucu gıda katkı maddeleri, 30 Haziran 2013 tarih ve 28693 sayılı Resmi Gazetede yayımlanarak yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğinde; “Gıdaları, mikroorganizmaların sebep olduğu bozulmalara ve/veya patojen mikroorganizmaların gelişmelerine karşı koruyarak raf ömürlerinin uzatılmasını sağlayan maddeler” olarak tanımlanmıştır [4]. Koruyucular E ve INS sisteminde 200-290 aralığında numaralanmışlardır [1, 5]. Bugün gıdalarda en çok kullanılan koruyucu maddeler, күкүрт dioksit ve çeşitli sülfidler, sorbik asit ve tuzları, nitrit ve nitrat bileşikler, propiyonik asit ve tuzları, asetik asit, benzoik asit ve tuzlarıdır.

Benzoatlar, süt, meyve suları ve sirkede; sorbatlar ise peynir, ekmek, tahıl, alkolsüz içecekler de yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar [3]. Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğinde sodyum benzoat ve potasyum sorbatın birlikte kullanıldığı

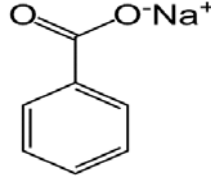
gıdalar “Alkolsüz aromalı içecekler (süt bazlı içecekler hariç), sıvı çay konsantreleri, sıvı meyve ve bitki infüzyon konsantreleri, sakramental kullanımlar için fermente edilmemiş üzüm suyu, hacmen %15’den az alkol içeren distile alkollü içkiler, düşük şekerli reçeller, jöle, marmelatlar ve benzeri düşük kalorili veya şekersiz ürünler ve diğer meyve bazlı sürülebilir ürünler, üstü şekerle kaplanmış, kristalize edilmiş ve parlatılmış meyve ve sebzeler, sirke salamura veya yağ içindeki sebzeler (zeytin hariç), zeytin ve zeytin bazlı ürünler, balık yumurtası ürünleri de dahil olmak üzere yarı korunmuş balık ürünleri, tuzlanmış kurutulmuş balık, ısıtma işlemi uygulanmamış süt bazlı tatlılar, sıvı yumurta, sakız, %60 veya daha fazla yağ içeren emülsifiye edilmiş soslar, %60’dan az yağ içeren emülsifiye edilmiş soslar, emülsifiye edilmemiş soslar, hazır salatalar, hardal, çeşnili maddeler ve lezzet vericiler, sıvı çorba ve et/tavuk/balık suları (konserveler hariç), bebek ve küçük çocuk gıdaları hariç olmak üzere “TGK-Kilo Verme Amaçlı Enerjisi Kısıtlanmış Gıdalar Tebliği” kapsamında yer alan ürünler, aroma vericiler, pişirilmiş kabuklular ve yumuşakçalar, sıvı formdaki gıda takviyeleri, %0,5’den daha fazla ilave fermente edilebilir şeker ve/veya meyve suyu veya meyve konsantresi içeren fıçı birası, Vitamin A ve D komplekslerinin ve Vitamin A’nın preparatlarını içeren kuru formdaki gıda takviyeleri” olarak belirtilmiştir [4, 6]. Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), benzoatın ve sorbatın günlük alınabilir değerini vücut ağırlığı başına 0-25 mg/kg olarak belirlemiştir [3, 7, 8]. Gıda katkı maddelerinin günlük alınabilir değerleri belirlense de bu maddelerin vücutta birikerek zamanla toksik etkiye yol açabileceği de açıklanmıştır. Katkı maddelerinin yarattığı riskler bazen uzun dönemde ortaya çıkabilmekte ve daha çok kronik hastalıklara da sebebiyet vermektedirler [1]. Bu nedenle gıda endüstrisinde kullanılacak katkı maddelerinin, kısa ve uzun vadede yaratacağı zararların ortaya konması büyük önem arz etmektedir.

Memeli hücrelerinde *in vitro* ve *in vivo* koşullarda çeşitli genotoksisite testleri gerçekleştirilmektedir. Genotoksisitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan testlerden biri mikronukleus (MN) testidir [9]. MN tekniği, kimyasal maddelerin ve fiziksel ajanların klastojenik ve anöjenik aktivitelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir testtir [10]. Mikronukleuslar hücre bölünmesi esnasında asentrik kromozom fragmentleri veya tüm bir kromozom kaybını göstermektedir [9]. Yapılan bilimsel çalışmalarda, MN frekansındaki artış ile kanser sıklığı arasında pozitif bir korelasyon olduğu belirtilmiştir [11-13]. Mikronukleuslar tamir edilmemiş veya yanlış tamir edilmiş DNA hasarlarından, iğ ipliği, kinetokor ya da diğer mitotik aparatların fonksiyon kaybından kaynaklanabilirler. Klastojen veya anöjenlere maruz kalınması halinde, hücre bölünmesinde görev yapan genetik kontrol noktalarında ve/veya DNA tamir genlerinde meydana gelen hatalardan dolayı da MN frekansı artabilir. Çünkü bütün bu olaylar, kromozomlarda yeniden düzenlenmeler, değişmiş gen ekspresyonları veya anöploidi gibi yollarla MN oluştururlar [14]. Bütün bu yapıların, farklı kanser tiplerinde ortaya çıkan kromozom düzensizlikleri ile ilişkili olduğu düşünülmekte ve son yıllarda yaygın olarak kanser takip ve önleme programlarında biyobelirteç ve tarama testi olarak kullanılmaktadır [15, 16].

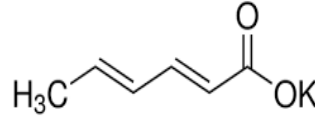
Bu çalışmada, gıdalarda yaygın olarak kullanılan koruyucu katkı maddelerinden benzoik asidin sodyum tuzu olan sodyum benzoat ile, sorbik asitin potasyum tuzu olan potasyum sorbat karışımının kültüre edilmiş insan periferik lenfositlerinde olası genotoksik etkileri mikronukleus testi ile incelenmiştir.

2. Deneysel çalışmalar

Bu çalışmada kullanılan gıda katkı maddelerinden biri sodyum benzoattır. Moleküler formülü $C_6H_5CO_2Na$ ($C_7H_5NaO_2$), moleküler ağırlığı 144,11 g/mol'dür. Yapısal formülü Şekil 1'de verilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız diğer gıda katkı maddesi ise potasyum sorbatır. Moleküler formülü $C_6H_7O_2K$ olup, moleküler ağırlığı 150,22 g/mol'dür. Yapısal formülü Şekil 2'de gösterilmiştir. Her iki test maddesi de beyaz kristal toz halinde olup, suda çözünürlükleri çok yüksektir.



Şekil 1. Sodyum benzoatın yapısal formülü [17].



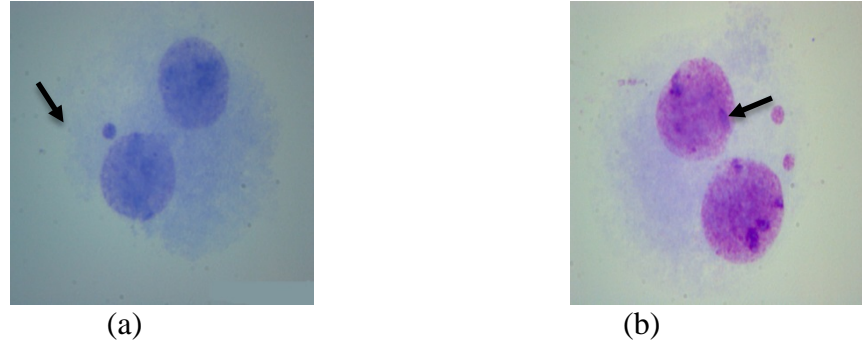
Şekil 2. Potasyum sorbatın yapısal formülü [18].

Bu çalışmada kullanılan periferik kan örnekleri (0.2 mL), sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, 24-25 yaşlarında sağlıklı bir bayan ve bir erkek donörden temin edilmiş ve içerisinde 2.5 mL'lik kromozom ortamı bulunan (Chromosome Medium B) tüplere ilave edilerek, 37°C'deki etüvde 72 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Gıda katkı maddelerinin konsantrasyonları, laboratuvar koşullarında yapılan ön çalışmalar ve Zengin ve ark. [19] ve Mamur ve ark. [20]'nın çalışmalarına göre belirlenmiştir. Karışımın 12.5 SB+125 PS; 12.5 SB+250 PS; 12.5 SB+500 PS; 25 SB+125 PS; 25 SB+250 PS; 25 SB+500 PS; 50 SB+125 PS; 50 SB+250 PS; 50 SB+500 PS $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonları lenfositlere 48 saat uygulanmıştır. Bir pozitif (Mitomisin-C, MMC) ve bir negatif kontrol grubu da bulundurulmuştur. Sitokinezi engellemek için tüm kültürlerle inkübasyonun 44. saatinde Sitokalsin-B (5.2 $\mu\text{g/mL}$) ilave edilmiştir. Mikronukleus testinin uygulanmasında Fenech ve arkadaşlarının [14] metodu bazı değişikliklerle [21] kullanılmıştır. Mikronukleus ve nükleer bölünme indeksinin belirlenebilmesi için, preparatlar %5'lik Giemsa boyası (pH 6.8) ile 15-20 dk boyanmıştır. Oda sıcaklığında kurutulan preparatlar, entellan ile daimi hale getirilmiş ve mikroskopik incelemeye alınmıştır.

Mikronukleus frekansının belirlenmesinde "binukleat" olarak adlandırılan, çekirdek bölünmesini tamamlamasına rağmen sitoplazma bölünmesini gerçekleştirilmemiş çift çekirdeğe sahip hücreler dikkate alınmıştır. Her donör için 1000 hücre olmak üzere her konsantrasyon için toplam 2000 hücre incelenmiştir. Nükleer bölünme indeksinin (NBİ) belirlenmesi amacıyla her donör için 500 olmak üzere her konsantrasyon için toplam 1000 hücre incelenmiştir. Hücreler 1 çekirdekli (1N), 2 çekirdekli (2N), 3 çekirdekli (3N) ve 4 çekirdekli (4N) şeklinde değerlendirilmiş ve nükleer bölünme indeksi Surrales ve ark.'na [22] göre $[1x(1N)+2x(2N)+3x(3N+4N)]/n$ (n incelenen toplam hücre sayısı) formülünden yararlanılarak hesaplanmıştır.

3. Bulgular

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, gıda katkı maddeleri olan SB+PS kombinasyonunun kültürdeki insan lenfositlerinde çalışılan tüm kombinasyonları mikronükleus (MN) frekansını artırmıştır. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ve konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmiştir ($r=0.78$) (Tablo 1). Çalışılan konsantrasyonlarda birli ve ikili MN içeren binükleat hücreye rastlanmıştır (Resim 1). Bu çalışmada, SB+PS kombinasyonunun hücre proliferasyon belirteci olan nükleer bölünme indeksi (NBİ) üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 1).



Resim 1. SB+PS kombinasyonunun oluşturduğu mikronükleuslu binükleat hücreler
a) bir mikronükleuslu binükleat hücre, b) iki mikronükleuslu binükleat hücre

Tablo 1. SB+PS kombinasyonunun *in vitro* insan lenfositlerinde MN frekansları ve NBİ üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		İncelenen binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları			MN \pm SH (%)	NBİ \pm SH
	Süre (saat)	Konsantras ($\mu\text{g/mL}$)		(1)	(2)	(3)		
Kontrol	48	0.00	2000	2	-	-	0.10 \pm 0.07	1.47 \pm 0.38
Pozitif kontrol (MMC)	48	0.20	2000	115	9	-	6.65 \pm 0.55	1.65 \pm 0.40
SB+PS	48	12.5+125	2000	8	-	1	0.55 \pm 0.16 *	1.97 \pm 0.44
		12.5+250	2000	8	1	-	0.50 \pm 0.15 *	1.72 \pm 0.41
		12.5+500	2000	12	1	-	0.70 \pm 0.18 **	1.70 \pm 0.41
		25+125	2000	14	1	-	0.80 \pm 0.19 **	1.78 \pm 0.41
		25+250	2000	12	-	-	0.60 \pm 0.17 **	1.76 \pm 0.41
		25+500	2000	15	-	-	0.75 \pm 0.19 **	1.72 \pm 0.41
		50+125	2000	15	-	-	0.75 \pm 0.19 **	1.89 \pm 0.43
		50+250	2000	14	1	-	0.80 \pm 0.20 **	2.06 \pm 0.45
		50+500	2000	13	2	-	0.85 \pm 0.20 ***	1.86 \pm 0.42

SB+PS: Sodyum benzoat+potasyum sorbat, MMC: Mitomisin-C, BN: Binükleat hücre, MN: Mikronükleus, NBİ: Nükleer bölünme indeksi, SH: Standart hata.

- * Kontrole göre $P < 0.05$ düzeyinde anlamlı (z testi)
- ** Kontrole göre $P < 0.01$ düzeyinde anlamlı (z testi)
- *** Kontrole göre $P < 0.001$ düzeyinde anlamlı (z testi)

4. Sonuçlar ve tartışma

Güvenli yiyeceklerin bulunabilirliği ve tüketimi, vücudun ihtiyaçları için çok önemlidir. Gıdalar ve bunların aktif bileşenleri insanlar üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Gıda

güvenliği tarih boyunca oldukça sık karşılaşılan bir sorun olmuştur. Gıdanın bozulmasının büyük bir kısmına, depolama sırasında meydana gelen mikroorganizmaların oluşturduğu enzimatik reaksiyonlar neden olmaktadır [23]. Bu biyolojik bozulmayı kontrol etmek için, çeşitli gıdalarda, koruyucu olarak da bilinen gıda katkı sınıfı olan antimikrobial maddeler, diğer faktörlerle birlikte, yüzyıllardır kullanılmaktadırlar [24]. Günümüzde hazır besinler çok daha sık tüketilir hale geldiğinden, insanlar bu maddelere gittikçe artan bir düzeyde maruz kalmaktadır. Bu maddelerin genotoksik, mutajenik ve karsinojenik potansiyele sahip olup olmadığının belirlenmesi gıda güvenliği ve insan sağlığı açısından oldukça büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmanın amacı gıdalarda katkı maddesi olarak yaygın kullanılan sodyum benzoat ve potasyum sorbat karışımının potansiyel genotoksik etkilerinin insan lenfositlerinde mikronukleus testi ile incelenmesidir.

Gıda koruyucu maddelerin genotoksik potansiyellerinin araştırılması ve gıda güvenliğinin sağlanması, toplum sağlığının iyileştirilmesindeki önemli konulardan biridir [25]. Günümüzde yaygın olarak kullanılan gıda katkı maddelerinin genotoksik potansiyelini çeşitli hücrelerde farklı genotoksisite testleriyle inceleyen pek çok çalışma mevcuttur [19, 20, 26-33].

Çeşitli kimyasal maddelerin ve fiziksel ajanların, memelilerde klastojenik ve anöjenik aktivitelerinin belirlenmesinde mikronukleus (MN) tekniği yaygın olarak kullanılmaktadır [10]. MN, asentrik kromozom materyalinden ya da iğ ipliklerinden ayrılarak kutuplara göç edemeyen kromozomlardan meydana gelir. Telofazda ayrı kalmış kromozomlar ve fragmentlerin etrafında çekirdek zarı teşekkül eder ve böylece ana çekirdekten daha küçük yapıda olan mikronukleuslar oluşur [9, 10]. Bu çalışmada SB+PS karışımının insan lenfositlerinde tüm uygulamalarda MN frekansını anlamlı düzeyde artırarak klastojenik ve/veya anöjenik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bazı araştırmacılar MN frekansının kanser çalışmalarında bir biyobelirteç olarak kullanıldığını belirtmişlerdir [10, 34]. MN, tümör hücrelerinde, DNA tamir mekanizması zarar görmüş hücrelerde ve hücre siklusu kontrol noktaları bozulmuş hücrelerde yüksek bulunmuştur [35].

Bu çalışmada SB+PS karışımının, hücre proliferasyon belirteci olan nükleer bölünme indeksini (NBİ) hiçbir uygulamada etkilemediği tespit edilmiştir. NBİ, mitojen cevapta ve lenfositlerdeki bağışıklık sistemi fonksiyonlarında biyobelirteç olarak kullanıldığı gibi, çeşitli kimyasalların sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır [36, 37]. NBİ, ayrıca, çekirdek bölünmesinin miktarı hakkında da fikir vermektedir. Sitokinezi bloklanmış hücreler, bölünme geçirmezse tek çekirdekli (mononükleat), bir kez bölünürse iki çekirdekli (binükleat) hücreler meydana gelir. Çekirdek sayısı ikiden fazla olan hücreler ise birden fazla bölünme geçirmiştir [38]. Bu bilgilere göre SB+PS karışımının hücre çoğalmasını ve hücre proliferasyon kinetiklerini etkilemediği söylenebilir.

Sodyum benzoat ve potasyum benzoatın *in vitro* genotoksik etkileri, insan periferik kan lenfositlerinde kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), MN ve comet testleri kullanılarak Zengin ve arkadaşları [19] tarafından belirlenmiştir. Bu katkı maddelerinin mitotik, replikasyon ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkileri de incelenmiştir. Sodyum benzoatın 6.25; 12.5; 25; 50 ve 100 µg/mL'lik konsantrasyonları, potasyum benzoatın ise 62.5; 125; 250; 500 ve 1000 µg/mL'lik konsantrasyonları kullanılmıştır. 24 ve 48 saatlik uygulamada her iki katkı maddesinin

de KA, KKD ve MN frekansında anlamlı ve doza bağlı bir artışa neden olduğu, mitotik indekste ise tüm uygulamalarda doza bağlı bir düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir. Replikasyon ve nükleer bölünme indekslerinin, söz konusu çalışmada kullanılan katkı maddeleri tarafından etkilenmediği saptanmıştır. Comet testi sonuçlarına göre, hem sodyum benzoat ve hem de potasyum benzoatın hemen hemen tüm dozlarda DNA hasarını kontrole göre artırdığı belirlenmiştir. Araştırmacılar her iki gıda katkı maddesinin de *in vitro* insan lenfositlerinde klastojenik, mutajenik, anöjenik ve sitotoksik etkili olabileceğini belirtmişlerdir [19]. Sodyum benzoatın tek başına da MN frekansını artırmış olması, ayrıca KA, KKD ve comet testlerinde de pozitif sonuçların elde edilmesi, SB+PS karışımının genotoksik potansiyeli olabileceği fikrini desteklemektedir.

Bu çalışmada karışımı oluşturan koruyuculardan bir diğeri olan potasyum sorbatın (PS) genotoksik potansiyeli, insan lenfositlerinde KA, KKD, MN ve comet testleri ile de değerlendirilmiştir [20]. Buna göre, PS'nin KA (500 ve 1000 µg/mL) ve KKD frekansını (24 saatlik uygulamada 250, 500, 1000 µg/mL ve 48 saatlik uygulamada 125, 250, 500, 1000 µg/mL konsantrasyonlarda) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, PS'nin izole lenfositlerde DNA hasarını tüm uygulamalarda artırdığı tespit edilmiştir. Buna karşın PS'nin insan lenfositlerinde MN frekansını ve NBI'ni etkilemediği gözlenmiştir. Mamur ve ark. [20]'na göre PS tek başına uygulandığında insan lenfositlerde MN frekansını anlamlı düzeyde artırmazken, bu çalışmadan elde edilen verilere göre PS'nin SB ile kombinasyonunda MN frekansını önemli düzeyde artırdığı gözlenmiştir. Bu durum bu iki koruyucu katkı maddesinin birlikte genotoksik potansiyel sergileyebileceğinin göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Mpountoukas ve arkadaşları [39] gıdalarda koruyucu olarak kullanılan potasyum sorbat, sodyum benzoat ve potasyum nitratın olası genotoksik ve sitotoksik potansiyellerini KKD testini kullanarak değerlendirmişlerdir. Bu amaçla söz konusu gıda katkı maddelerinin 8, 4, 2; 0.2 ve 0.02 mM'lık konsantrasyonlarını insan lenfosit hücrelerine uygulamışlardır. Yapılan analizler sonucunda potasyum sorbatın 4 ve 8 mM'lık konsantrasyonlarda, sodyum benzoatın ise 8 mM'lık konsantrasyonda KKD frekansını kontrole göre anlamlı düzeyde artırdığını belirlemişlerdir. Potasyum nitratın ise kullanılan konsantrasyonlarda herhangi bir toksik etkisinin olmadığını saptamışlardır. Söz konusu çalışmada üç koruyucu maddenin mitotik indeks üzerine etkileri de incelenmiştir. Potasyum nitratın 0.2 mM'lık konsantrasyonda mitotik indeksi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşürdüğünü, sodyum benzoatın uygulanan tüm konsantrasyonlarda mitotik indeksi etkilemediğini, potasyum sorbatın ise 4 ve 8 mM'lık konsantrasyonlarda zayıf sitotoksik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir [39].

Özdemir ve arkadaşları [31] koruyucu gıda katkı maddeleri sınıfında yer alan potasyum sorbat (E202), sodyum benzoat (E211) ve sodyum nitrit (E250)'in insan lenfosit hücre kültürlerindeki genotoksik etkilerini MN tekniği ile araştırmışlardır. Türk Gıda Kodeksinin önerdiği değerler dikkate alınarak potasyum sorbat için 200, 500 ve 1000 µg/mL, sodyum benzoat için 100, 300 ve 800 µg/mL, sodyum nitrit için ise 1, 10 ve 100 µg/mL'lik konsantrasyonlar kullanılmıştır. Potasyum sorbat ve sodyum benzoatın gıdalarda kullanılan konsantrasyonlarının herhangi bir genotoksik etkisinin olmadığını ancak sodyum nitritin uygulanan tüm konsantrasyonlarının genotoksik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir [31]. Özdemir ve ark. [31]'nin yaptıkları çalışmada kullandıkları donör sayısının ve saydıkları hücre sayılarının farklı olması ve deney koşullarındaki

bazı farklılıklar, sodyum benzoat ve potasyum sorbat genotoksisitesiyle ilgili farklı bir sonuç bulunmasına yol açmış olabilir.

2016 yılında Pandır ve ark. [40]'nın yaptıkları bir çalışmada, benzoik asitin 50, 100, 200 ve 500 µg /mL'lik konsantrasyonlarının potansiyel genotoksik etkisini comet testi ile incelemişlerdir. Benzoik asitin 500 µg/mL konsantrasyonunun, insan sperm hücrelerinde kontrole kıyasla comet kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentini anlamlı düzeyde artırdığı belirtilmiştir. Araştırmacılar benzoik asitin yüksek konsantrasyonlarının sperm hücrelerinde DNA hasarına yol açtığını bildirmişlerdir [40].

Yapılan kaynak araştırmalarına göre, SB+PS karışımının genotoksik potansiyeli ile ilgili bugüne kadar yapılmış her hangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Stanojevic ve arkadaşları [41], gıdalarda koruyucu katkı maddeleri olan sodyum benzoat, sodyum nitrit ve potasyum sorbatın kombinasyonunun (sodyum nitrit+sodyum benzoat, sodyum nitrit+potasyum sorbat, sodyum benzoat+potasyum sorbat), tek başına kullanılmalarına kıyasla, gıdalar üzerinde koruyucu etkiyi daha çok artırabileceğini vurgulamışlardır. Bu çalışmanın sonuçları bu kombinasyonların gıdalarda neden bu kadar fazla kullanıldığını da açıklamaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada, sodyum benzoat ve potasyum sorbat karışımının *in vitro* insan lenfositlerinde mikronukleus frekansını artırdığı, ancak bu karışımın nükleer bölünme indeksini etkilemediği belirlenmiştir. Klastojenik ve anöjenik etki, iğ ipliklerinin oluşumundaki bir inhibisyonundan, DNA bazlarının alkillenmesinden ya da her iki olaydan da kaynaklanabilir. Alkilleyici ajanlar DNA bazlarına alkil grupları bağlayarak, nükleotidlerde çapraz bağlar oluşturarak DNA hasarına yol açabilirler [42, 43]. Ayrıca klastojen veya anöjenlere maruz kalınması halinde, hücre bölünmesinde görev yapan genetik kontrol noktalarında ve/veya DNA tamir genlerinde meydana gelen hatalardan dolayı da MN frekansı artabilir [44, 45]. Bazı araştırmacılar sorbat ve benzoatın hücrel bağışıklık cevabında potansiyel baskılayıcı rolü olduğunu belirtmişlerdir [3]. Elde edilen bulgular ışığında, sodyum benzoat ve potasyum sorbat karışımının klastojenik ve anöjenik etkiyi artırabileceği ifade edilebilir. Bu nedenle bu maddelerin kombinasyonlarının gıdalarda koruyucu olarak kullanılmasında daha dikkatli olunmalıdır. Sonuçlar diğer genotoksisite testleri ve *in vivo* çalışmalarla da desteklenmelidir.

Kaynaklar

- [1] Saldamlı, İ. and Uygun, Ü. Gıda Katkı Maddeleri., Saldamlı, İ. (Editör). Gıda Kimyası, Dördüncü Baskı. Ankara. **Hacettepe Üniversitesi Yayınları**, 625-668, (2014).
- [2] Altuğ, T., Gıda Katkı Maddeleri., T. Altuğ (Editör). Gıda katkı maddeleri, Üçüncü Baskı. İzmir. **Kan Yılmaz Matbaacılık**, 1-16, (2009).
- [3] Shariati, M., Matin, S., Ghanei, M., Kalani, N., Nitrate, sorbate and benzoate a justification for the conflicting results of epidemiological studies of cancer in nutrition, **Journal of Fundamental and Applied Sciences**, 8, 3S, 2273-2285, (2016).
- [4] Türk Gıda Kodeksi, Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, **T.C. Resmi Gazete**, Sayı: 28157, (2011).
- [5] Türk Gıda Kodeksi, Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, **T.C. Resmi Gazete**, Sayı: 28693, (2013).

- [6] Ova, G., Koruyucular., T. Altuğ (Editör), Gıda katkı maddeleri, Üçüncü Baskı. İzmir. **Kan Yılmaz Matbaacılık**, 105-156, (2009).
- [7] FDA U. GRAS (Generally Recognized As Safe) food ingredients: Benzoic acid and sodium benzoate, **Food and Drug Administration**, Washington, DC, (1972).
- [8] Lück E., Food applications of sorbic acid and its salts, **Food Additives and Contaminants**, 7, 5, 711-5, (1990).
- [9] Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Bonassi, S., Holland, N., Migliore, L., Palitti, F., Natarajan, A.T. and Kirsch-Volders, M., Molecular mechanisms by which *in vivo* exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes *in vivo* and *ex vivo* in humans, **Mutation Research**, 770, 12-25, (2016).
- [10] Kirsch-Volders, M., Plas, G., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, L., Look, K.V. and Decordier, I., The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance, **Archives Toxicology**, 85, 8, 873-899, (2011).
- [11] Parry, J.M. and Kirsch-Volders, M., Special issue on *in vitro* MN trial, **Mutation Research**, 702, 132-134, (2010).
- [12] Chandirasekar, R., Kumar, B.L., Sasikala, K., Jayakumar, R., Suresh, K., Venkatesan, R., Jacob, R., Krishnapriya, E.K., Kavitha, R. and Ganesh, G.K., Assessment of genotoxic and molecular mechanisms of cancer risk in smoking and smokeless tobacco users, **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 767, 21-27, (2014).
- [13] Fenech, M., The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 455, 1, 81-95, (2000).
- [14] Huerta, I., Barasoain, M., Télez, M., Longa, M., Muga, J., Barrenetxea, G., Ortiz-Lastrad, E., Gonzálezd, J., Criado, B. and Arrieta, I., Genotoxic evaluation of five Angiotensin II receptor blockers: *In vivo* and *in vitro* micronucleus assay, **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 767, 1-7, (2014).
- [15] Bhatia, A. and Kumar, Y., Cancer cell micronucleus: an update on clinical and diagnostic applications, **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, 121, 7, 569-81, (2013).
- [16] Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C. and Fenech, M., Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies, **Mutagenesis**, 26, 1, 93-100, (2011).
- [17] Sodium Benzoate, https://www.google.com.tr/search?q=sodyum+benzoat&safe=active&rlz=1C1EJFA_enTR729TR729&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiOk4eUxNnYAhUkQZoKHcxhALgQ_AUICigB&biw=1600&bih=794#imgrc=HGBIDqAPSS-rM, (06.03.2018)
- [18] Potassium sorbate analytical standard, <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/47848?lang=en®ion=TR>, (06.03.2018)
- [19] Zengin, N., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S. and Aksoy, H., The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate, **Food and Chemical Toxicology**, 49, 4, 763-769, (2011).
- [20] Mamur, S., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F. and Yılmaz, S., Does potassium sorbate induce genotoxic or mutagenic effects in lymphocytes?, **Toxicology In Vitro**, 24, 790-794, (2010).

- [21] Palus, J., Rydzynski, K., Dziubaltowska, E., Wyszynska, K., Natarajan, A.T. and Nilsson, R., Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium, **Mutation Research**, 540, 19-28, (2003).
- [22] Surreales, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R., Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole blood and isolated human lymphocytes cultures, **Mutation Research**, 341, 169-184, (1995).
- [23] Shahmohammadi, M., Javadi, M. and Nassiri-Asl, M., An overview on the Effects of Sodium Benzoate as a Preservative in Food Products, **Biotechnology and Health Sciences**, 3, 3, e35084, (2016). DOI: 10.17795/bhs-35084.
- [24] Erickson M.C. and Doyle, M.P., The challenges of eliminating or substituting antimicrobial preservatives in foods, **Annual Review of Food Science and Technology**, 8, 371-90, (2017).
- [25] Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N. and Ünal, F., Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri, **Gıda/The Journal of Food**, 39, 3, 179-186, (2014).
- [26] Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., Yüzbaşıoğlu, D. and Çelik, M., Cytogenetic effects of citric acid and benzoic acid on *Allium* chromosomes, **Fresenius Environmental Bulletin**, 17, 8A, 1029-1037, (2008).
- [27] Yılmaz, S., Ünal, F. and Yüzbaşıoğlu, D., The *in vitro* genotoxicity of benzoic acid in human peripheral blood lymphocytes, **Cytotechnology**, 60, 1-3, 55-61, (2009).
- [28] Yılmaz, S., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D. and Çelik, M., DNA damage in human lymphocytes exposed to four food additives *in vitro*, **Toxicology and Industrial Health**, 30, 10, 926-37, (2014).
- [29] Çulcu, T., Sözen, E. and Tüylü, B. A. Determination of genotoxicants-induced DNA damage by using RAPD-PCR in human peripheral blood lymphocytes, **Fresenius Environmental Bulletin**, 19, 10, 2205-2209, (2010).
- [30] Mamur, S., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F. and Aksoy, H., Genotoxicity of food preservative sodium sorbate in human lymphocytes *in vitro*, **Cytotechnology**, 64, 553-562, (2012).
- [31] Özdemir, H., Turhan, A.B. and Arıkoğlu, H., Potasyum sorbat, sodyum benzoat ve sodyum nitrit'in genotoksik etkilerinin araştırılması, **European Journal of Basic Medical Sciences**, 2, 2, 34-40, (2012).
- [32] Türkoğlu, Ş., Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*, **Food and Chemical Toxicology**, 46, 6, 2035-2041, (2008).
- [33] Ataseven, N., Yüzbaşıoğlu, D., Keskin, A.Ç. and Ünal, F., Genotoxicity of monosodium glutamate, **Food and Chemical Toxicology**, 91, 8-18, (2016).
- [34] García-Quispes, W.A., Pastor, S., Biarnes, P.G.F., Castell, J., Velazquez, A. and Marcos, R., Influence of DNA-repair gene variants on the micronucleus frequency in thyroid cancer patients, **Mutation Research**, 750, 34-39, (2013).
- [35] Terradas, M., Martin, M., Tusell, L. and Genesca, A., Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?, **Mutation Research**, 705, 60-67, (2010).
- [36] Eastmond, D.A. and Tucker, J.D., Kinetochore localization in micronucleated cytokinesis-blocked Chinese hamster ovary cells: a new and rapid assay for identifying aneuploidy-inducing agents, **Mutation Research**, 224, 517-525, (1989).
- [37] Fenech, M., Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, **Nature Protocols**, 2, 5, 1084-1104, (2007).

- [38] Ionescu, M.E., Ciocirlan, M., Becheanu, G., Nicolaie, T., Ditescu, C., Teiusanu, A.G., Gologan, S.I. and Arbanas, T., Nuclear division index may predict neoplastic colorectal lesions, **Maedica (Buchar)**, 6, 3, 173-178, (2011).
- [39] Mpountoukas, P., Vantarakis, A., Sivridis, E. and Lialiaris, T., Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives, **Food and Chemical Toxicology**, 46, 7, 2390-2393, (2008).
- [40] Pandir, D., DNA damage in human germ cell exposed to the some food additives *in vitro*, **Cytotechnology**, 68, 725-733, (2016).
- [41] Stanojevic, D., Comic, I., Stefanovic O. and Solujic-Sukdolak S.L., Antimicrobial effects of sodium benzoate, sodium nitrite and potassium sorbate and their synergistic action *in vitro*, **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, 15, 307-311, (2009).
- [42] Pérez-Prior, M.T., Manso, J.A., García-Santos, M. del P., Calle, E. and Casado, J., Alkylating potential of potassium sorbate, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 6, 10244-10247, (2005).
- [43] Weber, G.F., DNA damaging drugs, **Molecular Therapies of Cancer**, 9-112, (2015). DOI 10.1007/978-3-319-13278-5_2.
- [44] Fenech, M. and Bonassi, S., The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes, **Mutagenesis**, 26, 43-49, (2011).
- [45] Mørck, T.A., Loock, K.V., Poulsen, M.B., Siersma, V.D., Nielsen, J.K.S., Hertel, O., Kirsch-Volders, M. and Knudsen, L.E., Micronucleus frequency in Danish school children and their mothers from the DEMOCOPHES population, **Mutagenesis**, 31, 1-8, (2016).