

## Ringkasan Pengkajian Keamanan Pangan Jagung PRG event MON 87460

### I. Pendahuluan

Jagung PRG event MON 87460 adalah jagung produk rekayasa genetik dari perusahaan Monsanto yang toleran terhadap kekeringan karena mengandung *cold shock protein B (CSPB)* yang berasal dari *Bacillus subtilis*.

Jagung PRG event MON 87460 mengandung dua kaset gen, yaitu gen penyandi *CSPB* dan gen penyandi *neomycin phosphotransferase II (NPT II)*.

*B. subtilis* sebagai sumber protein *CSPB* dan enzim-enzim dari mikroorganisme ini sudah umum dipakai untuk pangan (FDA, 1999; EFSA 2007; EPA, 1997; de Boer, *et al.*, 1991; Pedersen, *et al.*, 2002; Olempska-Beer *et al.*, 2006). Protein *CSPB* dari *B. subtilis* serupa (homolog) dengan protein *CSPB* yang ditemukan di *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, dan *Bifidobacterium* yang merupakan jenis bakteri yang umum ditemukan pada produk industri susu, keju, *sour cream*, *buttermilk*, yogurt dan probiotik (Morea *et al.*, 1999; Ogier *et al.*, 2002).

Gen *NPT II* diperoleh dari *E. coli* K-12 (Jefferson *et al.*, 1986). Protein *NPT II* telah banyak diteliti dalam hal penggunaan dan keamanannya (Nap *et al.*, 1992; Flavell, *et al.*, 1992). Gen *NPT II* yang menyandi ketahanan terhadap neomisin dan kanamisin telah digunakan sebagai marka seleksi dalam berbagai teknik kloning pada tanaman tomat, kapas, kanola dan jagung. Keamanan penggunaan gen *NPT II* telah dievaluasi secara menyeluruh oleh FDA (1994;1998).

Pengkajian keamanan pangan jagung PRG event 87460 dilakukan berdasarkan Peraturan Kepala Badan POM Nomor HK.03.1.23.03.12.1563 Tahun 2012 tentang Pedoman Pengkajian Keamanan Pangan Produk Rekayasa Genetik dan surat Kepala Badan POM kepada Ketua Komisi Keamanan Hayati Produk Rekayasa Genetik Nomor SD.11.05.52.10.11.09063 tanggal 31 Oktober 2011 perihal Pengkajian Keamanan Pangan Produk Rekayasa Genetik (PRG) Komoditas Jagung PRG Event MON 87460. TTKH telah melakukan pengkajian keamanan pangan jagung PRG event MON 87460 berdasarkan informasi genetik dan informasi keamanan pangan yang terdiri atas kesepadanan substansial, alergenitas, dan toksisitas sebagaimana diuraikan di bawah ini.

Jagung PRG event MON 87460 telah memperoleh sertifikat aman pangan di Australia (2010), Selandia Baru (2010) dan Amerika Serikat (2010).

### II. Informasi Genetik

#### II.1. Elemen Genetik

Jagung PRG event MON 87460 mengandung kaset gen *CSPB* penyandi *cold shock protein B* dan bertanggung jawab pada toleransi terhadap kekeringan, dengan promoter *rice actin (act1)* dan terminator *transcript 7 (tr7)*. Selain itu, jagung PRG event MON 87460 mengandung kaset gen *NPT II* penyandi ketahanan terhadap neomisin dan kanamisin dengan promoter *35S* dan terminator *nopaline synthase (NOS)*.

## II.2. Sumber Gen

Gen interes *CSPB* berasal dari bakteri *B. subtilis*, promoter *rice actin (act1)* berasal dari tanaman padi dan terminator *tr7* dari *Agrobacterium tumefaciens*. Gen *NPT II* sebagai marka seleksi berasal dari *E. coli*, promoter 35S berasal dari *Cauliflower mosaic virus*, dan terminator NOS dari *A. tumefaciens*.

## II.3. Sistem Transformasi

Perakitan jagung PRG event MON 87460 dilakukan melalui teknik transformasi dengan mediasi vektor *A. tumefaciens* strain ABI pada eksplan embrio biji jagung non PRG LH59. Plasmid vektor yang digunakan adalah PV-ZMAP595 yang mengandung dua sekuen *left* dan *right border* yang mengapit transfer DNA (T-DNA).

## II.4 Stabilitas Genetik

Hasil analisis stabilitas genetik gen interes dari jagung PRG event MON 87460 dengan *Southern blot fingerprint* menunjukkan bahwa sampai empat generasi BC3F1 masih stabil dan dapat dideteksi, sedangkan sekuen *backbone* plasmid PV-ZMAP595 tidak terdeteksi (Skipwith *et al.*, 2009). Stabilitas genetik pewarisan sifat pada jagung PRG event MON 87460 mengikuti prinsip segregasi Mendel. Jagung PRG event MON 87460 mengandung satu kopi gen interes *CSPB*.

Dari hasil pengkajian informasi genetik dapat disimpulkan bahwa jagung PRG event MON 87460 mengandung satu kopi gen interes (*CSPB*) dan satu kopi gen *NPT II*; tidak mengandung sekuen *backbone* dari plasmid transformasi PVZMAP595; masih stabil sampai empat generasi; dan diwariskan mengikuti hukum Mendel.

## III. Informasi Keamanan Pangan

### III.1 Kesepadanan Substansial

Pengkajian kesepadanan substansial dari jagung PRG event MON 87460 ini dilakukan dengan mempelajari hasil penelitian Harrigan *et al.* (2008).

Sampel biji dan bagian vegetatif untuk analisis komposisi diambil dari jagung PRG event MON 87460 dan jagung non-PRG yang ditanam selama percobaan tahun 2006/2007 di empat lokasi di Chili, yaitu Calera de Tango, Colina, Lumbreras, dan Quillota. Penanaman dilakukan di dua kondisi yang berbeda, yaitu kondisi dengan pengairan optimum dan kondisi dengan pengairan yang terbatas. Seluruh sampel dianalisis di laboratorium Covance Laboratories Inc., Madison, Wisconsin yang sudah menerapkan *Good Laboratory Practice (GLP)*.

Analisis komposisi yang dilakukan terhadap biji jagung adalah: proksimat (air, protein, lemak, dan abu serta karbohidrat *by-difference*), *acid detergent fiber (ADF)*, *neutral detergent fiber (NDF)*, *total dietary fiber (TDF)*, komposisi asam amino dan asam lemak (C8 - C22), vitamin (B1, B2, B6, E, niasin, dan asam folat), mineral (kalsium, tembaga, besi, magnesium, mangan, fosfor, kalium, natrium, dan seng), zat anti nutrisi (asam fitat dan rafinose), dan metabolit sekunder (furfural, asam ferulat, dan asam p-kumarat). Analisis komposisi yang dilakukan terhadap bagian vegetatif tanaman jagung adalah:

proksimat (air, protein, lemak, dan abu serta karbohidrat *by-difference*), ADF, NDF, dan mineral (kalsium dan fosfor).

Hasil analisis menunjukkan bahwa komposisi biji dan bagian vegetatif jagung PRG *event* MON 87460 tidak berbeda nyata dengan komposisi jagung non- PRG, baik yang ditanam dengan kondisi pengairan yang optimum maupun dengan kondisi pengairan terbatas. Secara umum komposisi biji jagung dan bagian vegetatif jagung PRG *event* MON 87460 masuk ke dalam kisaran komposisi biji jagung dan bagian vegetatif jagung komersial pada umumnya seperti dipublikasikan ILSI *Crop Composition Database* (ILSI, 2006).

Hasil pengkajian kesepadanan substansial menunjukkan bahwa jagung PRG *event* MON 87460 sepadan secara substansial dengan jagung non PRG.

### **III.2 Alergenisitas**

Berhubung jumlah protein yang dihasilkan oleh tanaman jagung sangat sedikit, maka untuk keperluan pengujian alergenisitas, protein *CSPB* dan protein *NPT II* diproduksi pada bakteri *E. coli*. Kesamaan sifat fisikokimia dan sifat fungsional kedua protein dianalisis dengan menggunakan SDS-PAGE, immunoblot, densitometri, spektrofotometri masa, MALDI-TOF peptide triptik, sekuen Nterminal, keberadaan glikosilasi, dan aktivitas biologi. Hasil analisis menunjukkan bahwa protein *CSPB* dan *NPT II* yang dihasilkan jagung PRG *event* MON 87460 setara dengan yang dihasilkan *E. coli* (Burzio *et al.*, 2008a; Gu *et al.*, 2008).

Semua percobaan dilakukan di laboratorium Monsanto *Company* 800 North Lindbergh Boulevard St. Louis, Missouri 63167 *Laboratory Project* ID Monsanto *Study Number*: REG-07-214 yang telah menerapkan *Good Laboratory Practice* (GLP).

#### **III.2.1 Analisis Bioinformatika**

Analisis kemiripan struktural protein *CSPB* dan *NPT II* dengan protein yang berpotensi menimbulkan alergi atau toksik dilakukan dengan menggunakan perangkat FASTA, data TOXIN6 dan TOX\_2009 untuk mengidentifikasi kemungkinan homologinya dengan protein yang berbahaya bagi kesehatan manusia dan hewan. Perangkat ALLERGEN SEARCH digunakan untuk mengidentifikasi kesamaan sekuen delapan asam amino (Burzio *et al.*, 2008b; Tu, 2009).

Hasil analisis homologi menunjukkan tidak adanya kemiripan struktural antara protein *CSPB* dan *NPT II* dengan toksin, alergen atau protein aktif biologis lainnya yang dapat membahayakan kesehatan manusia atau hewan (Thomas *et al.*, 2004; Codex, 2003, Silvanovich *et al.*, 2006, Thomas *et al.*, 2005).

#### **III.2.2 Konsentrasi Protein CSPB dan Protein NPT II**

Konsentrasi protein *CSPB* dalam biji jagung PRG *event* MON 87460 adalah 0,00005% dari total protein biji jagung, sedangkan konsentrasi protein *NPT II* adalah 0,000006%. Oleh karena itu, protein *CSPB* dan *NPT II*, mewakili bagian yang sangat kecil dari total protein dalam biji jagung PRG *event* MON 87460.

### III.2.3 Stabilitas Protein

Uji daya cerna *in vitro* protein *CSPB* di dalam simulasi cairan lambung (SGF, *simulated gastric fluid*) dan usus (SIF, *simulated intestinal fluid*) dilakukan menggunakan metode standar (Thomas *et al.*, 2004).

Daya cerna protein *CSPB* di dalam SGF dan SIF dianalisis dengan SDS-PAGE dan *Western blot*. Hasil analisis menunjukkan bahwa protein *CSPB* terurai dalam waktu 30 detik dalam SGF dan 5 menit dalam SIF.

Protein *NPT II* sudah dilaporkan dalam banyak studi sebagai protein yang aman (Fuchs *et al.*, 1993a; 1993b; EPA, 1994).

Berdasarkan hasil pengkajian alergenitas dapat disimpulkan bahwa jagung PRG *event* MON 87460 yang mengandung protein *CSPB* dan *NPT II* tidak menunjukkan adanya potensi menimbulkan alergi.

### III.3 Toksisitas

Pengujian toksisitas protein *CSPB* dan *NPT II* yang dihasilkan oleh jagung PRG *event* MON 87460 telah dilakukan di laboratorium yang menerapkan GLP.

#### III.3.1 Toksisitas Akut Protein *CSPB*

Berhubung jumlah protein yang dihasilkan oleh tanaman jagung sangat sedikit, maka untuk keperluan pengujian, protein *CSPB* diproduksi pada bakteri *E. coli*. kivalensi protein *CSPB* yang dihasilkan oleh tanaman jagung PRG *event* MON 87460 dengan yang dihasilkan oleh bakteri *E. coli*, telah diuji dan dilaporkan (Burzio *et al.*, 2008a). Hasil pengujian tersebut menyimpulkan bahwa protein *CSPB* yang dihasilkan oleh bakteri *E. coli* setara dengan protein *CSPB* yang dihasilkan oleh tanaman jagung PRG *event* MON 87460.

Pengujian toksisitas akut protein *CSPB* telah dilakukan dan hasilnya telah dilaporkan (Monsanto, 2008). Bahan yang diuji berupa larutan protein *CSPB* murni. Sebagai kontrol, digunakan larutan *bovine serum albumin* (BSA).

Hewan percobaan yang digunakan adalah 60 ekor mencit, strain CD-1, mencit jantan berumur sekitar 8 minggu dengan berat badan 29,8 - 32,7 gram dan mencit betina berumur sekitar 13 minggu dengan berat badan 27,1 - 29,9 gram; berasal dari Charles River Laboratories, St. Constant, Quebec. Selanjutnya hanya sebanyak 20 ekor mencit jantan dan 20 ekor mencit betina yang digunakan. Sebelum digunakan dalam pengujian semua mencit dibiarkan beradaptasi dengan lingkungan laboratorium selama 7 hari. Semua mencit ditempatkan dalam kandang *stainless steel* secara individual, baik selama masa aklimatisasi maupun selama studi dilaksanakan.

Ransum (PMI Nutrition International Certified Rodent Chow # 5002), diberikan secara *ad libitum* selama pengujian berlangsung. Air minum yang sudah diproses dengan *reverse osmosis* dan iradiasi ultraviolet diberikan secara *ad libitum*.

Sebanyak 40 ekor mencit dibagi ke dalam dua kelompok, yaitu 10 ekor mencit jantan dan 10 ekor mencit betina digrupkan sebagai kelompok kontrol, sedangkan 20 ekor mencit lainnya (10 ekor jantan dan 10 ekor betina) digrupkan sebagai kelompok perlakuan. Dosis yang diberikan untuk BSA dan CSPB adalah 6 mg protein per kg BB dalam volume 33,3 ml larutan/kg BB. Pada hari ke nol, mencit ditimbang kemudian dipuaskan selama 2 - 3 jam sebelum diberi cekokan bahan uji atau kontrol. Pemberian bahan uji atau kontrol hanya dilakukan sekali, menggunakan *syringe* yang dihubungkan dengan *gavage cannula*. Pengujian berlangsung selama 14 hari.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa pada semua kelompok (1) tidak terdapat mencit yang mati; (2) tidak terdapat tanda-tanda kelainan klinis pada mencit; (3) tidak ditemukan perbedaan nyata dalam hal konsumsi ransum, berat badan dan perubahan berat badan antar kelompok; (4) tidak ditemukan adanya kelainan pada organ dalam mencit.

Dari pengujian tersebut disimpulkan bahwa tidak terdapat efek merugikan pada mencit akibat pemberian protein CSPB sampai dosis 4,70 mg/kg berat badan. Oleh karena itu dianggap bahwa nilai *no-observed-adverse-effect level* (NOAEL) protein CSPB adalah 4,70 mg/kg berat badan. Nilai tersebut merupakan tiga sampai empat kali lebih tinggi dari estimasi konsumsi protein CSPB oleh manusia.

### **III.3.2 Toksisitas Akut Protein NPT II**

Berhubung jumlah protein yang dihasilkan oleh tanaman jagung sangat sedikit, maka untuk keperluan pengujian tersebut, protein *NPT II* diproduksi pada bakteri *E. coli*. Ekuivalensi protein *NPT II* yang dihasilkan oleh tanaman jagung PRG event MON 87460 dengan yang dihasilkan oleh bakteri *E. coli*, telah diuji dan dilaporkan (Gu *et al.*, 2008). Hasil pengujian tersebut menyimpulkan bahwa protein *NPT II* yang dihasilkan oleh bakteri *E. coli* ekuivalen dengan protein *NPT II* yang dihasilkan oleh tanaman jagung PRG event MON 87460.

Pengujian toksisitas akut protein *NPT II* telah dilakukan dan hasilnya telah dipublikasikan (Fuchs *et. al.*, 1993b).

Bahan yang diuji berupa larutan protein *NPT II* murni. Sebagai kontrol, digunakan larutan dapar karbonat 0,1 M (*dosing vehicle*). Hewan percobaan yang digunakan adalah 40 ekor mencit jantan galur CD-1 berumur sekitar 7 minggu dengan berat badan sekitar 30,3 - 37,3 g, dan 40 ekor mencit betina galur CD-1 berumur sekitar 9 minggu dengan berat badan sekitar 23,3 to 30,8 g; berasal dari the Charles River Breeding Laboratory, Portage, MI. Setelah diterima, semua mencit dibiarkan mengalami aklimatisasi terhadap lingkungan laboratorium selama 14 hari sebelum dilakukan pencekokan bahan uji. Semua mencit diberi tanda secara individual pada telinganya dan ditempatkan dalam kandang secara individual, dengan siklus penerangan 12 jam (terang dan gelap).

Masing-masing 10 ekor mencit (jantan dan betina) diberi cekokan protein *NPT II* (yang dilarutkan dalam dapar karbonat 0,1 M) dengan dosis: 0, 100, 1000 dan 5000 mg per kg

berat badan. Mencit grup kontrol (10 ekor) hanya diberi cekokan larutan dapar sebanyak 1 ml. Karena kelarutan protein *NPT II* dalam larutan dapar yang terbatas, maka pengekokan dilakukan dua kali pada hari yang sama dengan selang waktu 4 jam. Setelah dilakukan pengekokan semua mencit diberi air minum dan ransum (*Purina Certified Rodent Chow, # 5002*) secara *ad libitum*. Percobaan dilakukan selama 7 hari.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa pada semua kelompok: (1) tidak terdapat mencit yang sakit maupun mati; (2) tidak terdapat tanda-tanda kelainan klinis; (3) tidak ditemukan perbedaan nyata dalam hal konsumsi ransum maupun berat badan akhir; (4) tidak ditemukan adanya kelainan organ dalam mencit.

Dari hasil pengujian tersebut disimpulkan bahwa protein *NPT II* yang diberikan pada mencit sampai dosis 5000 mg per kg berat badan, tidak bersifat toksik pada mencit. Dari hasil pengkajian toksisitas dapat disimpulkan bahwa jagung PRG *event* MON 87460 yang mengandung protein *CSPB* dan *NPT II* tidak bersifat toksik.

#### **III.4 Studi Pemberian Pakan pada Ayam Broiler**

Studi pemberian pakan pada ayam broiler telah dilaporkan (Davis, 2008). Bahan uji adalah jagung PRG *event* MON 87460, sedangkan sebagai control digunakan jagung DM 1718. Sebagai pembanding (*reference*) digunakan jagung BT 6613, Garst 8445, DKC60-15, DKC61-42, DKC63-78 dan RX 715. Selanjutnya masing-masing jagung tersebut dihancurkan dan dicampurkan dengan pakan ayam sampai homogen. Hewan percobaan yang digunakan adalah anak ayam broiler jantan dan betina komersial DOC (Ross × Ross 308) yang diperoleh dari Hoover's Hatchery, Inc. Rudd, IA.

Disain percobaan yang dilakukan adalah sebagai berikut: pada hari ke 0, sebanyak 800 ekor anak ayam broiler jantan dan betina secara acak dibagi menjadi 8 kelompok, sesuai dengan perlakuan (50 ekor jantan dan 50 ekor betina per perlakuan). Percobaan dilaksanakan selama 42 hari, yaitu periode *starter* hari ke 0 sampai ke 20 dan periode *grower* hari ke 21 sampai ke 42. Pakan dan air diberikan secara *ad libitum*.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa: (a) berat badan anak ayam per ekor pada hari ke 0 rata-rata 35,50 g (jagung PRG *event* MON 87460) dan 35,85 g (kontrol dan pembanding); (b) berat badan ayam per ekor pada hari ke 42 adalah rata-rata 2,709 kg (jagung PRG *event* MON 87460) dan 2,681 kg (kontrol dan pembanding); (c) konsumsi pakan rata-rata per ekor ayam selama 42 hari percobaan adalah 4,379 kg (jagung PRG *event* MON 87460) dan 4,264 kg (kontrol dan pembanding); (d) konversi pakan (*feed gain*) rata-rata per ekor ayam adalah 1,638 kg/kg BB (jagung PRG *event* MON 87460) dan 1,625 kg/kg BB (kontrol dan pembanding). Tidak terdapat perbedaan nyata untuk semua parameter uji antara kelompok perlakuan, kelompok kontrol dan kelompok pembanding.

Berdasarkan hasil studi pemberian pakan pada ayam broiler dapat disimpulkan bahwa jagung PRG *event* MON 87460 dapat dianggap mempunyai nilai nutrisi sebanding dengan jagung kontrol dan pembanding.

#### IV. Kesimpulan

Atas dasar hasil pengkajian tentang informasi genetik, kesepadanan substansial, alergenisitas, dan toksisitas disimpulkan hal-hal sebagai berikut:

1. Jagung PRG *event* MON 87460 mengandung satu kopi gen interes *CSPB* dan satu kopi gen *NPT II*; tidak mengandung sekuen *backbone* dari plasmid transformasi PV-ZMAP595; gen interes masih stabil sampai empat generasi; dan diwariskan mengikuti hukum Mendel.
2. Informasi keamanan pangan:
  - a. jagung PRG *event* MON 87460 sepadan secara substansial dengan jagung non PRG;
  - b. jagung PRG *event* MON 87460 yang mengandung protein *CSPB* dan *NPT II* tidak menunjukkan adanya potensi menimbulkan alergi; dan
  - c. jagung PRG *event* MON 87460 yang mengandung protein *CSPB* dan *NPT II* tidak bersifat toksik.
3. TTKH menilai bahwa jagung PRG *event* MON 87460 yang diajukan adalah aman untuk dikonsumsi sebagai bahan pangan.
4. Apabila kemudian ditemukan data dan informasi baru yang tidak sesuai dengan data keamanan pangan yang diperoleh hingga saat ini, maka status keamanan pangan jagung PRG *event* MON 87460 perlu dikaji ulang.
5. Apabila setelah ditetapkan aman pangan, kemudian produk tersebut terbukti menimbulkan dampak negatif terhadap kesehatan manusia maka pemohon wajib melakukan tindakan pengendalian dan penanggulangan, serta menarik jagung PRG *event* MON 87460 dari peredaran.
6. Jagung PRG *event* MON 87460 tidak boleh digunakan sebagai pakan ternak sampai memperoleh sertifikat aman pakan.
7. Jagung PRG *event* MON 87460 tidak boleh dibudidayakan sampai ditetapkan aman lingkungan.

#### V. Daftar Acuan

Burzio, L.A., Wang, C. and Rice, E.A., 2008a. *Characterization of the Bacillus subtilis Cold Shock Protein B (CSPB) Purified from the Grain of Drought Tolerant Corn MON 87460 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the MON 87460-Produced and E. coli-Produced CSPB Proteins*. Monsanto Study Number. REG-07-214.

Burzio, L.A., McClain, J.S. and Silvanovich, A., 2008b. *Bioinformatics Evaluation of the CSPB Protein Utilizing the AD8, TOXIN6, and Protein Databases*. Monsanto Study Number. REG-08-091. Codex Alimentarius Commission, 2003. *Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants*. CAC/GL 45-2003.

Davis S.W., 2008. *Comparison of Broiler Performance and Carcass Parameters When Fed Diets Containing MON 87460, Control, or Reference Corn*. CQR Study Number MN-07-3, Monsanto Study Number. 07-01-B3-18.

de Boer, A.S. and Diderichsen, B., 1991. *On the Safety of Bacillus subtilis and B. amyloliquefaciens: A Review. Appl. Microbiol Biotechnol* 36:1-4.

EFSA, 2007. *Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) Approach for Assessment of Selected Microorganisms Referred to EFSA. The EFSA Journal* 587, 1-16.

EPA, 1994. *Neomycin phosphotransferase II. Tolerance exemption; Final rule. U.S. Environmental Protection Agency. Federal Register* 59, 49353–49354.

EPA. 1997. *Bacillus subtilis final risk assessment. U.S. Environmental Protection Agency Biotechnology Program Under Toxic Substances Control Act (TSCA).*

FDA, 1994. *Secondary Direct Food Additives Permitted in Food for Human Consumption; Food Additives Permitted in Feed and Drinking Water of Animals; Aminoglycoside 3'-Phosphotransferase II. Federal Register* Vol. 59 No. 98.

FDA, 1998. *Guidance for Industry: Use of Antibiotic Resistance Marker Genes in Transgenic Plants. Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of Premarket Approval, September 4, 1998.*

FDA, 1999. *Carbohydrase and Protease Enzyme Preparations Derived From Bacillus Subtilis or Bacillus Amyloliquefaciens; Affirmation of GRAS Status as Direct Food Ingredients. Federal Register* Vol. 64, No. 78.

Flavell R, Dart E, Fuchs R, and Fraley R., 1992. *Selectable marker genes: Safe for plants?' Bio/Technology* 10:141-144.

Fuchs, R.L., Heeren, R.A., Gustafson, M.E., Rogan, G.J., Bartnicki, D.E., Leimgruber, R.M., Finn, R.F., Hershman, A. and Barberich, S.A., 1993a. *Purification and Characterization of Microbially Expressed Neomycin Phosphotransferase II (NPT II) Protein and its Equivalence to the Plant Expressed Protein. Biotechnology* 13:1537-1542.

Fuchs, R.L., Ream, J.E., Hammond, B.G., Naylor, M.W., Leimgruber, R.M. and Barberich, S.A., 1993b. *Safety assessment of the neomycin phosphotransferase 11 (NPT II) protein. Bio/Technology*, 11:1543-1547.

Gu, X., Burzio, L.A., and Elena, A., 2008. *Assessment of the Physicochemical Equivalence of the Plant-Produced NPT II Protein from the Leaf of MON 87460 to the E. coli-Produced NPT II Protein. Monsanto Study Number: REG-07-311.*

Harrigan, D.D., K. D. Miller, dan R. Sorbet. 2008. *Amended Report for MSL0021180: Compositional Analyses of Forage and Grain Collected from Drought Tolerant Corn MON 87460 Grown in a 2006/2007 Chile Field Production. Monsanto Company, Study 07-01-83-39, MSL0021754.*



International Life Sciences Institute (ILSI). 2006. *Crop Composition Database, Version 3.0*, <http://www.cropcomposition.org>. Accessed 26 October 2009.

Jefferson, R.A., Burgess, S.M. and Hersh, D., 1986. B-Glucoronidase from *Escherichia coli* as a Gene-fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol 83, pp. 8447- 8451.

Monsanto, 2008. *An Acute Toxicity Study of Cold Shock Protein B Administered by the Oral (Gavage) Route to Mice*. Monsanto Study No. CRO-2007-182, 5 Juni 2008.

Morea, M., Baruzzi, F. and Coconcelli, P.S., 1999. *Molecular and Physiological Characterization of Dominant Bacterial Populations in Traditional Mozzarella Cheese Processing*. *Journal of Applied Microbiology* 87: 574-582.

Nap, J.P., Bijvoet, J. and Stiekema, W.J., 1992. *Biosafety of Kanamycin- Resistant Transgenic Plants*. *Transgenic Research* 1, 239-249.

Ogier, J.C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P. and Delacroix-Buchet, A., 2002. *Identification of the Bacterial Microflora in Dairy Products by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis*. *Applied and Environmental Microbiology*, Aug: 3691-3701.

Olempska-Beer, Z.S., Merker, R.I., Ditto, M.D. and DiNovi, M.J., 2006. *Foodprocessing Enzymes from Recombinant Microorganisms-A Review*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 45 (2006): 144-158.

Pedersen, P.B., Bjornvard, M.E., Rasmussen, M.D. and Petersen, J.N., 2002. *Cytotoxic Potential of Industrial Strains of Bacillus sp.* *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 36, 155-161.

Silvanovich, A., Nemeth, M.A., Song, P., Herman, R., Tagliani, L. and Bannon, G.A., 2006. *The Value of Short Amino Acid Sequence Matches for Prediction of Protein Allergenicity*. *Toxicological Sciences* 90 (1), 258-2-258.

Skipwith, A., Feng, D., Groat G, Tian Q, and Masucci J., 2009. *Molecular Analysis of Corn MON 87460*. MSL-0020487, *An Unpublished Study Conducted by Monsanto Company*.

Thomas, K., Aalbers, M., Bannon, G.A., Bartels, M., Dearman, R.J., Esdaile, D.J., Fu, T.J., Glatt, C.M., Hadfield, N., Hatzos, C., Hefle, S.L., Heylings, J.R., Goodman, R.E., Henry, B., Herouet, C., Holsapple, M., Ladies, G.S., Landry, T.D., MacIntosh, S.C., Rice, E.A., Privalle, L.S., Steiner, H.Y., Teshima, R., van Ree, R., Woolhiser, M. and Zawodny, J., 2004. *A Multi-laboratory Evaluation of a Common in Vitro Pepsin Digestion Assay Protocol Used in Assessing the Safety of Novel Proteins*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39: 87-98.

Thomas, K., Bannon, G., Hefle, S., Herouet, C., Holsapple, M., Ladics, G., MacIntosh, S. and Privalle, L., 2005. *In Silico Methods for Evaluating Human Allergenicity to Novel*

*Proteins: International Bioinformatics Workshop Meeting Report, 23-24 February 2005. Toxicological Sciences 88(2): 307-310.*

Tu, H., 2009. *Updated Bioinformatics Evaluation of the NPT II Protein Utilizing the AD\_2009 and TOX\_2009 Databases. Company Report. Monsanto Company. 800 North Lindbergh Blvd. St. Louis, MO 63167.*