

转基因抗虫作物中苏云金芽孢杆菌 Cry 蛋白的食品安全问题

王春玲, Bruce Hammond*

孟山都生物技术研究(北京)有限公司, 北京 100190

摘要: 苏云金芽孢杆菌(Bt)微生物制剂是农业、林业和饮用水等领域用来控制靶标害虫幼虫的有效工具,至今已经有 50 余年的使用历史。同时其在美国、欧洲和其他一些国家被广泛用于经过认证的有机农业生产之中。目前已获审批的转基因 Bt 作物中最常使用的是 Cry 蛋白。Cry 蛋白的作用机制、食品安全性以及致敏性已经经过啮齿类动物、农场动物和人体内试验和生物信息学研究的严格检验。Cry 蛋白的杀虫作用只在靶标害虫的碱性消化道内,与中肠上皮细胞的特异蛋白受体结合才能起到杀虫作用,而其他非靶标生物体内(人类、猕猴、小鼠、大鼠和牛等)都被证明没有这种特异蛋白质受体。美国、欧洲和其他国家的管理机构都已经证实了转基因 Bt 作物和 Cry 蛋白在农作物和饮用水中残留的安全性。食物加工过程能够最大化地减少转基因作物中功能性 Cry 蛋白的摄入。转基因抗虫作物有利于降低农药杀虫剂的使用的同时,也能够有效防止玉米中伏马菌毒素的污染。

关键词: 转基因;抗虫;苏云金芽孢杆菌;Cry 蛋白;食品安全

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2011.04.02

Food Safety of Bt Cry Proteins from Biotechnology-derived Crops

WANG Chun-ling, Bruce Hammond*

Monsanto Biotechnology Research (Beijing) Company, Beijing 100190, China

Abstract: Bt microbial insecticides have been used to control larval insect pests that feed on agricultural crops, forest and drinking water for over 50 years. They are also widely used in certified organic agricultural food production in the United States, Europe and other countries. Cry proteins are most commonly introduced in registered Bt crops. Mode of action, food safety and allergenicity of Cry protein have been rigorously tested using rodent, farm animals, and human experiment and bioinformatics research tools. The insecticidal function of Cry protein only works in the alkaline environment of the insect gut where specific receptors on the membranes of midgut epithelial cells present. Other non-target organisms (humans, rhesus monkeys, mice, rats and cows etc.) lack these receptors. Regulatory agencies in US, EU and other countries have confirmed the history of safe consumption of Bt crop and Cry protein residues on crops and in drinking water. Food processing can minimize dietary intake to functionally active Cry proteins. Bt crop contributes to reduce use of insecticides and improves the safe consumption of corn grain by lowering contamination from fumonisin mycotoxins.

Key words: Genetically Modified; Insect Resistance; *Bacillus thuringiensis*; Cry protein; food safety1

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种常见的需氧性细菌,可以生长在不同的环境介质中,包括土壤、水、植物表面、谷物粉尘及昆虫宿主。当细菌缺少生长所需的一种或多种营养素时,作为其正常生命周期的一部分,该细菌会在类芽胞体中产生一种或多种杀虫蛋白。苏云金芽孢

杆菌(Bt)这种微生物多年来一直被用做控制以农作物为食的害虫幼虫的工具,并且在美国、欧洲和其他一些国家被广泛用于经过认证的有机农业生产之中。当将 Bt 微生物药剂喷洒在农作物的叶子上后,昆虫幼虫就会进食植物细胞、孢子和药剂中的杀虫蛋白。杀虫蛋白以原毒素蛋白的形式

收稿日期:2011-08-26; 接受日期:2011-09-19

作者简介:王春玲,博士,孟山都公司中国区法规政策与科学事务部总监。Tel:8610-5829-0863; E-mail:chunling.wang@monsanto.com。

* 通讯作者:Bruce Hammond,博士,孟山都公司生物技术毒理学技术总监。E-mail:bruce.g.hammond@monsanto.com

存在,而在昆虫的碱性肠道环境中,蛋白酶将其转换为具有活性的昆虫毒素。它们与昆虫中肠上皮细胞膜上的特定受体结合,并在细胞膜上形成微孔,从而使肠液中的水和电解质渗入细胞,这会使昆虫的中肠上皮细胞肿胀进而溶解。其后由于细胞中的电解质进入了昆虫血淋巴,从而引起电解质失衡,最终导致昆虫麻痹,昆虫因而停止进食并死亡。孢子还可在虫体内发芽并进行繁殖^[1~4]。

自然界中主要有两种类型的 Bt 杀虫晶体蛋白, Cry (crystal 的简写) 蛋白和 Cyt (cytolytic 的简写) 蛋白,且在每种 Bt 蛋白都存在相当多的不同变异株。另外,还有一种被称为营养生长期杀虫蛋白 (VIP) 的类型,这种蛋白在细菌营养生长期产生。

苏云金芽孢杆菌 Cry 蛋白是 Bt 微生物产品中的一种杀虫成分,被用作生物杀虫剂已经有超过 50 年的历史。由于其具有物种特异性(只控制靶标害虫)且环境残留少,因此被认为是高度环保的杀虫剂^[1~4]。这类杀虫剂在中国也已经被广泛应用了几十年,数万吨的各类 Bt 微生物杀虫剂在农作物(大米、蔬菜、玉米)、森林及水系中应用,以控制人类病源的载体蚊子及其他昆虫幼虫^[1,5]。在一些必须将饮用水储存在容器中的地方,Bt 微生物会被添加到饮用水中以控制蚊子幼虫等的生长^[1]。

由于微生物可以被雨水冲洗掉,且在喷洒农药后的几天内 Cry 蛋白会在阳光下失去活性,因而 Bt 微生物施用于叶子表面进行杀虫的效果有限^[4]。随着生物技术的发展,将编码 Cry 蛋白的基因转到植物中已成为可能,这样 Cry 蛋白可在植物中表达并且在整个生长季保护植物避免虫害。虽然营养期杀虫蛋白 (VIP) 现已转入农作物内,但目前,大多数商业转基因 Bt 作物仍是基于 Cry 蛋白^[6],而已经商业化的 Bt 作物还没有使用 Cyt 蛋白。

1 Cry 蛋白的作用机理及食品安全性

Cry 蛋白的总体作用机理已被深入地研究并且已经出版了很多篇综述^[1~4,7]。Cry 蛋白不像化学农药那样通过接触直接杀虫,它必须被摄入

体内并且被靶标害虫的碱性肠道内的蛋白酶激活。被激活的毒素结合到昆虫中肠上皮细胞的特异性受体位点上,并在细胞膜上形成膜孔,使得中肠细胞溶解、电解质失衡,引发败血症,最后导致昆虫的死亡。

只有那些在肠上皮细胞上具有特定受体的昆虫才会受 Cry 蛋白的影响。其他非靶标生物(人类、猕猴、小鼠、大鼠和牛等)体内缺乏此类受体^[8~11]。因此这些生物即使在进食了上千或百万倍的对靶标害虫产生急性毒性反应的剂量时,也不会受到不利影响^[12]。据估算,一个成年人必须在一天内食用 90 万 kg 的未做熟 Bt 转基因玉米,才能达到相当于对小鼠进行急性试验所使用的等同剂量的 Cry1Ab 蛋白 (4 000 mg/kg)^[12]。大量的综述文章总结了 Bt 微生物杀虫剂及单独的 Cry 蛋白的动物毒理学结果,而 Bt 微生物产品和转基因 Bt 作物长期的安全使用记录支持了 Cry 蛋白具有安全性^[1~4,7,13~15]。与化学农药相反,在农业中使用中人体不良反应与 Bt 微生物杀虫剂的使用没有相关性^[1,4]。在早期的 Bt 微生物安全评估实验中,人类志愿者口服了 10^{10} 个 Bt 孢子,连续服用 5 d,而且呼吸道吸入了 10^9 个 Bt 孢子,而没有不良反应发生^[14]。在世界各地不同地方的室外贮水设施中,会在饮用水中添加 Bt 微生物以控制病媒昆虫^[1]。在欧洲,一些农业上使用 Bt 微生物杀虫剂的地区,商店里的新鲜蔬菜中有 Bt 微生物 10^4 CFU (菌落形成单位)/g 水平的残留^[1,16]。在最近一个对 Bt 安全性所作的回顾中指出,“在世界上的很多地区,新鲜蔬菜经常在收获后几天内就上市,而这些蔬菜上市前不久曾被喷施 Bt。这在有机农业方式生产销售的过程中尤为普遍。对诸如西兰花、黄瓜、西红柿、菜花和生菜等仅经过简单冲洗即生食的蔬菜进行喷施 Bt 杀虫剂尤为普遍。在这些案例中,人类直接食用了成千上万的 Bt 孢子和杀虫晶体蛋白”^[4]。

监管机构已经证实了作物和饮用水中残留的 Cry 蛋白的长期安全食用历史,其结论是:苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*) 的使用模式可能导致进食新鲜农产品上可能残留的细菌孢子,但是,由于毒理学上不存在危险,对于一般民众和婴幼儿来说,消费 Bt 杀虫剂处理过的商品不会产生风

险^[17]。同时,在饮用水或食物中,还没有报道称 Bt 会对人类健康造成不良影响^[1]。由于其安全性和在农业上的长期安全使用记录,在 Bt 微生物已经注册的国家均已免除设定上限允许剂量^[3]。Bt 微生物于 1961 年首次在美国注册^[2]。根据前几年的数据,在美国至少有 180 种 Bt 微生物产品注册^[17],在欧盟有 120 多种微生物产品注册。据报道,在中国大约注册有 276 种 Bt 微生物产品^[18]。

2 转基因 Bt 作物安全性评估

2.1 作物中 Bt 转基因成分的安全性评估

与从 Bt 微生物中提取的 Cry 蛋白类似的蛋白编码基因已被转入各种不同的农作物品种中。在植物中 Cry 蛋白的表达处于较低水平(10^{-6} mol/L),因为这样的低水平足以控制靶标害虫^[12]。如前所述,目前仅有 Cry 蛋白和 VIP 蛋白被用于已获审批的转基因 Bt 作物中,使得转基因作物的杀虫机制比 Bt 微生物药剂成分简单得多。作为一个蛋白质家族,Cry 蛋白种类非常多,使得转基因 Bt 植株可以杀死不同种类的害虫幼虫。目前用于饲料和食品的已商品化的转基因 Bt 作物主要是转基因 Bt 玉米和棉花。在美国和其他国家审批的转基因 Bt 植物产生的 Cry 蛋白包括 Cry1Ab、Cry1F、Cry1A. 105、Cry1Ac、Cry2Ab2、Cry3Bb、Cry34Ab1 和 Cry35Ab1。VIP 蛋白也已在美国注册用于农作物中^[6]。每一个注册的转基因 Bt 作物都根据国际食品法典的建议接受了安全性评价,转入的 Cry1Ac 和 Cry1C 蛋白的食品安全性已被评估^[2,19,20],其中包括蛋白质特性、在模拟消化液中进行潜在的消化率评估、在小鼠中进行急性高剂量口服毒性试验、与已知毒素和致敏原进行氨基酸序列比对及对非靶标生物的作用。

根据上述国际食品法典的指导方针(2009 年),评估转入蛋白质的潜在致敏性是通过对比转入蛋白质的生化特性与已知致敏原的特性进行比较。以下 4 种情况下可以认定新引进的蛋白质不太可能具有致敏性:①该蛋白质的来源为非致敏原;②该蛋白质只占植物蛋白质总量的极小部

分;③在使用生物信息学搜索工具与已知致敏原氨基酸序列进行的同源比对中,未发现该蛋白质与已知致敏原的氨基酸序列具有结构同源性;④该蛋白质在模拟消化液中可以被消化。所有在转基因 Bt 作物中表达的 Cry 蛋白均已根据上述食品法典的指导对潜在致敏性进行了评估。那些被用于商业转基因 Bt 作物中的蛋白质与已知蛋白质致敏原的特性不同,即它们很容易在模拟胃液中被消化,且通常蛋白质的表达水平低(mmol/L 级),通过生物信息学搜索与已知的致敏原在结构上不具有相关性。在过去几十年里,商业上生产和使用了成千上万吨的 Bt 微生物制剂,没有迹象表明在生产制造过程中以及在农业操作和森林养护中施用 Bt 微生物的工人发生过过敏性反应^[4,7]。同样,20 世纪 90 年代以来生产了百万吨的转基因 Bt 作物,没有在这些加工处理或食用此类谷物或种子的人群中发生致敏反应的报告。曾有报道称在农作物上喷洒 Bt 微生物制剂的工人中有出现致敏反应的状况,但此类致敏反应并不是由于暴露于 Cry 蛋白而引起的,而是由 Bt 制剂中的其他蛋白质成分而引起^[4,7]。但此类反应在人类接触到“外来”或非人类蛋白质时,经常会被观察到。

啮齿类动物高剂量急性毒性试验已经验证了 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1F、Cry2Ab2、Cry3Bb1、Cry34Ab1 和 Cry35Ab1 蛋白^[2,12,19,21]。对小鼠试验用剂量是人类可能的一次性食用转基因 Bt 玉米时摄取剂量的几千到几百万倍^[12]。

欧洲食品安全局(EFSA)对玉米植株中所表达的 Cry 蛋白的食品安全进行了评估,如 Cry1Ab 和 Cry3Bb1^[22]、Cry1F^[23]、Cry34Ab1 和 Cry35Ab1^[24]和包含的一种以上 Cry 蛋白的玉米杂交品种^[25,26]。在转基因 Bt 作物 90 d 大鼠喂养实验中,无论含有一种或多种 Cry 蛋白,均未观察到不良反应。添加到鼠类饲料中的玉米粒仅是简单地进行了研磨,没有进行加工处理。如前所述,哺乳动物消化道内没有 Cry 蛋白结合位点,因此当进食一种或多种不同的 Cry 蛋白时,它们不会产生不良反应。

对于农场饲养类动物,也曾经做过许多的喂饲研究,如对家禽、猪和反刍动物饲喂 Bt 微生物

农药和转基因 Bt 作物^[1~4,7,15,27~32]。在这些研究中,受试组动物与对照组动物在生长及饲料消耗方面表现相同,没有不良反应记录。

2.2 食品加工过程对人类进食转基因作物中 Cry 蛋白的影响

包括 Cry 蛋白在内的蛋白质功能取决于其三维结构及其外围环境的影响作用(静电力、范德华力作用、氢键和疏水作用)^[33,34]。在一般情况下,蛋白质结构仅在有限的生理条件范围内保持一定的稳定性,且很容易受环境变化的干扰,如温度改变、pH 变化或物理干扰,都可能超出蛋白质维持正常折叠结构的能力^[34]。这些作用可导致蛋白质变性,变性作用继而导致蛋白质结构的急剧变化,且必然导致其生物功能的完全丧失。变性的多肽链更像一个无规则的线圈,而非一个折叠式蛋白质结构。典型的变性不涉及蛋白质一级结构的变化(氨基酸序列),即多肽链的降解。

食物来源蛋白的环境变化通常发生在种子或粮食被加工成人类食物的过程中。例如,在将玉米和大豆加工成食物的过程中,加热、高压下的挤压、机械粉碎、pH 变化及还原剂的使用等,均会破坏蛋白质的天然结构和/或通过水解肽键改变蛋白质的一级结构^[35,36]。在典型的玉米和大豆加工成食物组分的过程中,经常会加热到 95 ~ 100℃^[37~39],尽管这样的高温并不会改变变性蛋白作为膳食氨基酸来源的营养价值,但是可导致不可逆转的变性并使蛋白质功能丧失^[40,41]。食物加工有助于消化道的代谢功能,因为蛋白酶(如胃蛋白酶和胰蛋白酶)可以更快且有效地裂解变性后蛋白质的无规则多肽链结构,而不容易裂解原始的三维折叠构象蛋白质^[42]。

沉淀的方法通常用来将蛋白质与其他食物组分(如脂类)进行分离,因为蛋白质物理性质的变化可以降低其溶解度,进而聚合或沉淀。多聚蛋白也可以分解成单体造成功能的丧失^[36,43]。使用免疫检测的方法,仍有可能通过抗原决定基检测到变性、聚集或沉淀的蛋白质。在一些外源引入的蛋白质中观察到了这种现象,但在其他蛋白中未发现^[40,41,44~47]。由于加工食品中蛋白质会发生变性,在一般情况下,不经常采用免疫方法检测转入蛋白质;免疫检测方法主要用于检测生鲜

农产品^[40,46,48]。然而,无论是否可以检测抗原部位,转入的蛋白质均已失去了其功能活性。

通过体外热稳定性研究检查了 Bt 作物转入蛋白质是否在食品加工后仍保持杀虫活性。Cry1Ab、Cry1F、Cry34Ab1 和 Cry35Ab1 蛋白曾被加热到 60 ~ 90℃,持续 10 ~ 30 min^[23,24,40]。这些 Cry 蛋白受处理的条件与玉米和大豆被加工成人类食品时所使用的加热条件相同,甚至更为保守。在抗虫生物测定试验中进行加热时,所有的蛋白质均丧失了其杀虫活性。食品加工过程对转入蛋白的功能活性的影响也许与其他被加工的作物也相似,比如对大米食物的操作。当进食此类作物加工过的食物时,摄取任何具有功能活性的 Cry 蛋白的可能性即便有,也非常小。

综上所述,科学论断支持了欧洲食品安全局的结论,即风险评估者应考虑食品加工过程对转入蛋白质水平的影响,作物经常被加工成食物成分或混入加工过的配方食品中,因而新的蛋白质和/或新的基因产物还会发生二次损耗,基因产物的每日理论最大摄入量(TMDI)会显著降低。如果不考虑食物加工过程所产生的影响,可能会过高估计了潜在的转入蛋白质的摄取量,设定出对人类更高的安全边际^[28]。

2.3 转基因 Bt 作物减少了玉米中的伏马菌毒素含量

在中国的种植玉米区,伏马菌毒素也是常见的玉米污染毒素^[49~51]。摄入伏马菌毒素能引起农场动物及人类多种健康危害^[49~54]。除了抗虫性,很多国家都发现其种植的转基因 Bt 玉米杂交种中的伏马菌毒素的含量会比非转基因 Bt 抗虫玉米低^[55]。玉米种植环境中存在很多种能够产生毒素的真菌,如镰刀菌等。它们可以通过因昆虫取食而受损的植物组织进入玉米植株内,到达植物组织(茎秆、穗部等)。因为 Cry 蛋白可通过控制害虫减少害虫对植株的损害,因而减少了真菌感染的可能,进而减少霉菌毒素的污染。

3 结论

对 Bt 微生物杀虫剂和转基因 Bt 作物所做的食品安全性评估研究证明两者对人类非常安全。

转基因 Bt 玉米和大豆,可能还包括大米,在食品加工时会使 Cry 蛋白失活,因此加工可以最大限度地减少摄取具有功能活性的 Cry 蛋白。如文中所述,即使摄取了非常大量的具有功能活性的 Cry 蛋白,也仍然是无毒副作用的。基于广泛的安全性数据、Bt 微生物产品近 50 年的安全使用历史以及转基因 Bt 农作物产品 14 年的安全使用记录,Bt 技术已在世界的许多国家被采用。此类技术还被证明助于减少杀虫剂的使用,并通过降低伏马菌毒素的污染而提高玉米谷物的食用安全性。

参 考 文 献

- [1] WHO/IPCS (International Programme on Chemical Safety). Environmental Health Criteria 217: Microbial Pest Control Agent *Bacillus thuringiensis* [Z]. Geneva, Switzerland: Monsanto Technical, 1999.
- [2] Betz F S, Hammond B G, Fuchs R L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests [J]. Regul. Toxicol. Pharmacol., 2000, 32, 156 - 173.
- [3] OECD. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control proteins[A]. In: Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology[Z]. Paris, France, 2007.
- [4] Federici B, Siegel J. Safety assessment of *Bacillus thuringiensis* and Bt crops used in insect control[A]. In: Hammond B G, (ed.) Food Safety of Proteins in Agricultural Biotechnology [M]. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2008.
- [5] Yang Z. Commercialization of *Bacillus thuringiensis* insecticides in China[EB/OL]. www. biotech. or. th/unesco/file% 203. ppt, 2003.
- [6] EPA. *Bacillus thuringiensis* VIP3A insect control protein and the genetic material necessary for its production; notice of a filing to a pesticide petition to amend the exemption from the requirement for a tolerance for a certain pesticide chemical in or on food [R]. Federal Register, 2004, 69 (178): 55605 - 55608.
- [7] Siegel J P. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides[J]. J. Invertebr. Pathol., 2001, 77 (1): 13 - 21.
- [8] Sacchi V F, Parenti P, Hanozet G M, et al.. *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺ - gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells[J]. FEBS Lett., 1986, 204 (2): 213 - 218.
- [9] Hofmann C, Luthy P, Hutter R, et al.. Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*) [J]. Eur. J. Biochem., 1988, 173 (1): 85 - 91.
- [10] Noteborn H P J M, Bienenmann-Ploum M E, van den Berg J H J, et al.. Safety assessment of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein CRYIA(b) expressed in transgenic tomato[A]. In: Engel K H, Takeoka G R, Teranishi R (eds.) Genetically Modified Foods; Safety Issues [C]. Washington, D. C: American Chemical Society, 1995, 12: 134 - 147.
- [11] Shimada N, Miyamoto K, Kanda K, et al.. *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Ab toxin does not affect the membrane integrity of the mammalian intestinal epithelial cells: an *in vitro* study[J]. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim., 2006, 42 (1 - 2): 45 - 49.
- [12] Hammond B, Cockburn A. The safety assessment of proteins introduced into crops developed through agricultural biotechnology: a consolidated approach to meet current and future needs[A]. In: Food Safety of Proteins in Agricultural Biotechnology[Z]. New York: CRC Press, 2008, 259 - 288.
- [13] Fisher R, Rosner L. Toxicology of the microbial insecticide, thuricide [J]. J. Agric. Food Chem., 1959, 7 (10): 686 - 688.
- [14] Siegel J P, Shaddock J A. Safety of Microbial Insecticides to Vertebrates-human[A]. In: Laird M, Lacey L, Davidson E (eds), Safety of Microbial Insecticides [M]. Boca Raton: CRC Press, 1990, 101 - 113.
- [15] McClintock J, Schaffer C, Sjoblad R. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides[J]. Pestic. Sci., 1995, 45: 95 - 105.
- [16] Frederiksen K, Rosenquist H, Jørgensen K, et al.. Occurrence of natural *Bacillus thuringiensis* Contaminants and Residues of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides on fresh fruits and vegetables[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2006, 72 (5): 3435 - 3440.
- [17] EPA. EPA Registration Eligibility Decision (RED) *Bacillus thuringiensis* EPA 738-R-98-004[Z]. 1998.
- [18] Huang D F, Zhang J, Song F P, et al.. Microbial control and biotechnology research on *Bacillus thuringiensis* in China[J]. J. Invert. Pathol., 2007, 95: 175 - 180.
- [19] Cao S, He X, Xu W, et al.. Safety assessment of Cry1C protein from genetically modified rice according to the national standards of PR China for a new food source [J]. Regul. Toxicol. Pharmacol., 2010, 58 (3): 474 - 481.
- [20] Codex 2009, WHO/FAO. Foods derived from modern biotechnology[M]. (2nd edition) Rome: World Health Organization, 2009.
- [21] Juberg D R, Herman R A, Thomas J, et al.. Acute and repeated dose (28 day) mouse oral toxicology studies with Cry34Ab1 and Cry35Ab1 Bt proteins used in coleopteran resistant DAS-59122-1 Corn[J]. Regul. Toxicol. Pharmacol., 2009, 54: 154 - 163.
- [22] European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the Sci-

- entific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the notification (reference C/DE/02/9) for the placing on the market of insect-protected genetically modified maize MON 863 x MON 810, for import and processing, under Part C of Directive 2001/18/EC from Monsanto[Z]. The EFSA Journal, 2005, 251:1 - 22.
- [23] EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an application (reference EFSA-GMO-NL-2004-02) for the placing on the market of insect-tolerant genetically modified maize 1507, for food use, under Regulation (EC) No 1829/2003 from Pioneer Hi-Bred International/Mycogen Seeds [Z]. The EFSA Journal, 2005, 182:1 - 22.
- [24] EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an application (reference EFSA-GMO-NL-2005-12) for the placing on the market of insect-resistant genetically modified maize 59122, for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003, from Pioneer Hi-Bred International, Inc. and Mycogen Seeds, c/o Dow Agrosciences LLC [Z]. The EFSA Journal, 2007, 470:1 - 25.
- [25] EFSA. Scientific Opinion on application (reference EFSA-GMO-NL-2005-15) for the placing on the market of the insect-resistant and herbicide-tolerant genetically modified maize 1507 x 59122, for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Mycogen Seeds, c/o Dow AgroSciences LLC and Pioneer Hi-Bred International, Inc. as represented by Pioneer Overseas Corporation [Z]. The EFSA Journal, 2009, 1074:1 - 28.
- [26] EFSA. Scientific Opinion on application (EFSA-GMO-NL-2007-39) for the placing on the market of insect resistant and herbicide tolerant genetically modified maize MON89034 x MON88017 for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) [Z]. The EFSA Journal, 2010, 8(3):1564.
- [27] Brake J, Faust M A, Stein J. Evaluation of transgenic event Bt 11 hybrid corn in broiler chickens[J]. Poultry. Sci., 2003, 82: 551 - 559.
- [28] EFSA. Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed; the role of animal feeding trials[J]. Food Chem. Toxicol., 2008, 46:S2 - S70.
- [29] Scheideler S E, Rice D, Smith B, *et al.*. Evaluation of nutritional equivalency of corn grain from DAS-15 7-1 (Herculex I) in the diets of laying hens[J]. J. Appl. Poultry. Res., 2008, 17:383 - 389.
- [30] Taylor M L, Hartnell G, Nemeth M, *et al.*. Comparison of broiler performance when fed diets containing corn grain with insect-protected (corn rootworm and European corn borer) and herbicide-tolerant (glyphosate) traits, control corn, or commercial reference corn-revisited [J]. Poultry. Sci., 2005, 84:1893 - 1899.
- [31] Taylor M, Hartnell G, Nemeth M, *et al.*. Comparison of broiler performance when fed diets containing grain from second-generation insect-protected and glyphosate-tolerant, conventional control or commercial reference corn[J]. Poultry. Sci., 2007, 86:1972 - 1979.
- [32] Mc Naughton J L, Roberts M, Rice D, *et al.*. Feeding performance in broiler chickens fed diets containing DAS-59122-7 maize grain compared to diets containing non-transgenic maize grain [J]. Anim. Feed Sci. Tech., 2007, 132:227 - 239.
- [33] Branden C, Tooze J. Introduction to Protein Structure[M]. New York: Garland Publishing, 1991.
- [34] Creighton T E. Proteins: Structures and Molecular Properties [M]. New York: W. H. Freeman Company, 1993.
- [35] Kilara A, Sharkasi T. Effects of temperature on food proteins and its implications on functional properties [J]. Crit. Rev. Food Sci. Nutri., 1986, 23(4):323 - 395.
- [36] Meade S, Reid E, Gerrard J. The impact of processing on the nutritional quality of food proteins [J]. J. AOAC Intern., 2005, 88(3):904 - 922.
- [37] Berk Z. Technology of production of edible flours and protein products from soybeans [Z]. FAO Agricultural Services Bulletin No. 1992, 97.
- [38] Duensing W J, Roskens A B, Alexander R J. Chapter 11. Corn Dry Milling: Processes, Products, and Applications [Z]. In: White P, Johnson L, (eds) Corn Chemistry and Technology [M]. (2nd edition) St Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists, Inc., 2003, 407 - 447.
- [39] Rooney L W, Serna-Saldivar S O. Chapter 13. Food Use of Whole Corn and Dry-Milled Fractions [Z]. In: White P, Johnson L, (eds) Corn Chemistry and Technology [M]. (2nd edition) St Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists, Inc., 2003, 495 - 535.
- [40] de Luis R, Lavilla M, Sanchez L, *et al.*. Immunochemical detection of Cry1A(b) protein in model processed foods made with transgenic maize [J]. Eur. Food Res. Technol., 2009, 229, 15 - 19.
- [41] Thomas K, Herouet-Guicheney C, Ladis G, *et al.*. Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: international workshop report [J]. Food Chem. Toxicol., 2007, 45:1116 - 1122.
- [42] Herman R A, Storer N P, Gao Y. Acid-induced unfolding kinetics in simulated gastric digestion of proteins [J]. Reg. Toxicol. Pharmacol., 2006, 46:93 - 99.
- [43] Schultz R M, Liebman M N. Chapter 3. Proteins I: Composition and Structure [Z]. In: Devlin, T. M. (eds) Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations [M]. (5th edition) New York: Wiley-Liss, 2002, 93 - 157.
- [44] Terry C, Harris N, Parkes H C. Detection of genetically modified crops and their derivatives; critical steps in sample preparation and extraction [J]. J. AOAC Intern., 2002, 85:

- 768 – 774.
- [45] Grothaus G D, Bandla M, Currier T, *et al.* . Immunoassay as an analytical tool in agricultural biotechnology[J]. J. AOAC Internat. , 2006,89(4) :913 – 928.
- [46] Margarit E, Reggiardo M, Vallejos R, *et al.* . Detection of Bt transgenic maize in foodstuffs[J]. Food Res. Internat. ,2006, 39;250 – 255.
- [47] Codex Alimentarius Commission, Committee on Sampling and Detection Methods (CCMAS). Proposed draft guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification, and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in food. (At step 5/8 of the procedure) [Z]. ALINORM 10/33/23. Appendix III. , 47 – 68.
- [48] Bogani P, Minunni M, Spiriti M, *et al.* . Transgenes monitoring in an industrial soybean processing chain by DNA-based conventional approaches and biosensors [J]. Food Chem. , 2008,113;658 – 664.
- [49] Li F Q, Yoshizawa T, Kawamura O, *et al.* . Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China[J]. J. Agric. Food Chem. ,2001, 49;4122 – 4126.
- [50] Lian M, Yang Y, Su J, *et al.* . Validation of fumonisin biomarkers in high-risk population of liver cancer[J]. Toxicol. Sci. , 2003,72;241.
- [51] Wang J S, Wang S K, Su J J, *et al.* . Food contamination of fumonisin B₁ in high-risk area of *Esophageal* and liver cancer [J]. Toxicologist,2003,72;913.
- [52] CAST. Mycotoxins. Risks in Plant, Animal, and Human Systems[Z]. Council for Agricultural Science and Technology. Task Force Report No. 2003,139.
- [53] Marasas W F O, Riley R L, Hendricks K A, *et al.* . Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and *in vivo*; a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize[J]. J. Nutr. , 2004,134;711 – 716.
- [54] Wu F, Miller J D, Casman E A. The economic impact of Bt corn resulting from mycotoxin reduction[J]. J. Toxicology. , 2004,23(2 – 3);393 – 419.
- [55] Ostry V, Ovesna J, Skarkova J, *et al.* . A review on comparative data concerning *Fusarium* mycotoxins in Bt maize and non-Bt isogenic maize[J]. Mycot. Res. , 2010,26;141 – 145.