

## Yoghurt zonder klonten

Zuivelbedrijven die yoghurt bereiden, krijgen soms een opbrengst van waterige melk met klonten, veroorzaakt door bacteriofagen in de yoghurtcultuur. Dankzij CRISPR-Cas kan dit voorkomen worden.

Yoghurt wordt gemaakt door melk te enten met de melkzuurbacteriën *Streptococcus thermophilus* en *Lactobacillus bulgaricus*. Deze bacteriën zetten melkeiwitten om en verbruiken lactose (melksuiker) uit de melk voor hun energievoorziening. Hierdoor verzuurt de melk snel en krijgt die een andere smaak, structuur en voedingswaarde: het wordt yoghurt. Doordat yoghurt veel minder lactose bevat dan melk is het een geschikt zuivelproduct voor mensen met lactose-intolerantie.

Na het eten van yoghurt hebben de yoghurtbacteriën die levend de darm bereiken een gunstig effect op de darmflora, de stoelgang en het immuunsysteem van de darm.

De twee bacteriesoorten zijn samen efficiënter in het veranderen van de melk in yoghurt dan ieder apart. Zo produceert *L. bulgaricus* voornamelijk endopeptidasen, enzymen die peptidebindingen binnen een peptideketen verbreken, en produceert *S. thermophilus* voornamelijk exopeptidasen, enzymen die peptide-bindingen aan de uiteinden van een peptideketen verbreken.

De enzymactiviteit van *S. thermophilus* is hoger als deze bacterie samen met *L. bulgaricus* aan melk wordt toegevoegd dan als alleen *S. thermophilus* wordt toegevoegd.

- 1p 16 Verklaar deze hogere enzymactiviteit van *S. thermophilus* op moleculair niveau.

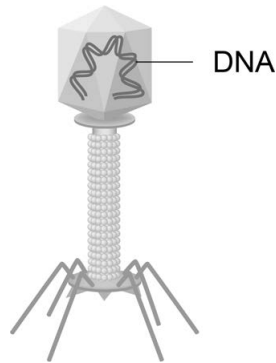
Dankzij de activiteit van de melkzuurbacteriën zijn voedingsstoffen uit yoghurt sneller op te nemen dan uit melk, ook voor mensen die geen lactose-intolerantie hebben.

- 1p 17 Geef hiervoor een verklaring.

Als de melkzuurbacteriën geïnfecteerd worden door virussen kan de yoghurt mislukken. Zo'n type virus wordt bacteriofaag, of kortweg faag genoemd (afbeelding 1).

In afbeelding 2 is een bacterie weergegeven met daarop vele fagen.

afbeelding 1



afbeelding 2



De fagen vermeerderen zich door enzymen te gebruiken van de bacteriën die ze hebben geïnfecteerd.

- 2p 18 Welk type polymerase van de bacterie wordt gebruikt voor de vermeerdering van deze fagen?
- A alleen DNA-polymerase
  - B alleen RNA-polymerase
  - C zowel DNA-polymerase als RNA-polymerase

Bacteriën kunnen zich verdedigen tegen fagen met behulp van restrictie-enzymen die de vermeerdering van de fagen remmen. Restrictie bij bacteriën is te vergelijken met immunologische afweer bij de mens. Bij beide processen vindt herkenning van een moleculaire structuur plaats.

- 2p 19 Welk type molecuul wordt herkend bij restrictie? En welk type molecuul wordt doorgaans herkend bij een immunologische reactie bij de mens?

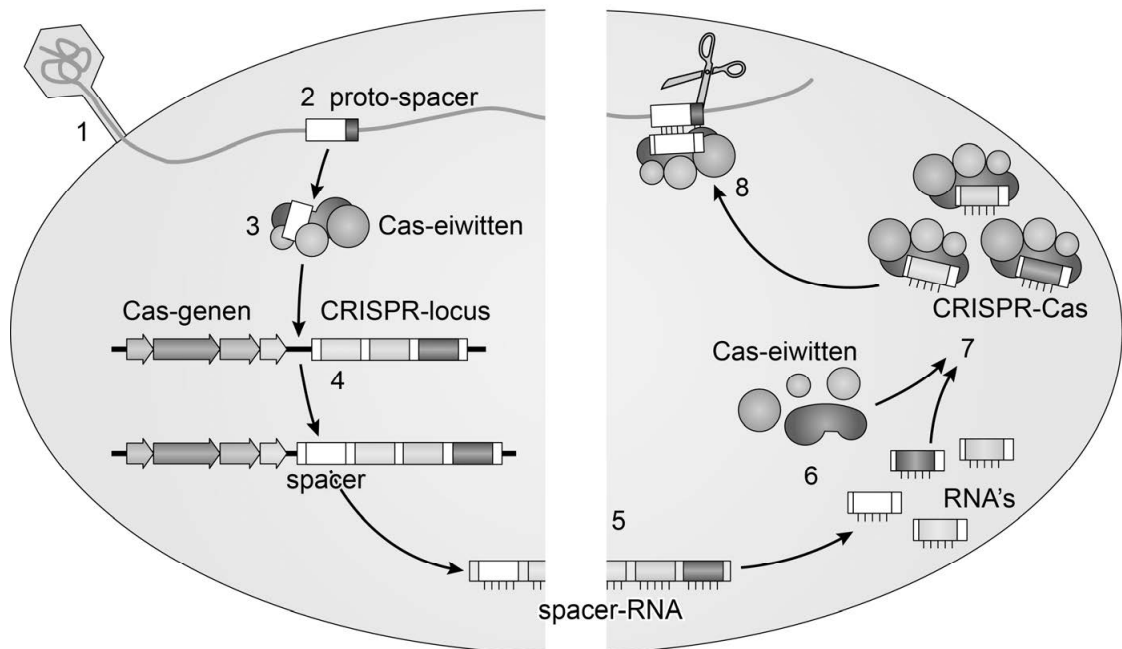
herkend bij restrictie	herkend bij immunologische reactie bij de mens
A eiwit	DNA
B eiwit	eiwit
C DNA	DNA
D DNA	eiwit

Een zuivelbedrijf gaf microbiologen de opdracht om te bepalen welke DNA-sequenties van melkzuurbacteriën betrokken zijn bij de afweer tegen fagen. Het mechanisme dat de bacteriën gebruiken om zich tegen fagen te verdedigen, is met hulp van microbiologen van Wageningen UR verder ontrafeld en staat nu bekend onder de naam CRISPR-Cas. CRISPR's (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) zijn plaatsen in het bacteriële DNA waar, ingesloten tussen repeats, korte segmenten vreemd DNA zijn ingebouwd. Cas-eiwitten (CRISPR-associated eiwitten) kunnen hiermee vreemd DNA herkennen en doorknippen. In afbeelding 3 is de reactie van het CRISPR-Cas-systeem op een eerste contact met faag-DNA (primaire reactie) en op een volgend contact (secundaire reactie) schematisch weergegeven.

**afbeelding 3**

**primaire reactie (immunisatie)**

**secundaire reactie (immuunreactie)**



- 1 Een faag hecht aan een bacterie en injecteert het faag-DNA in de bacterie.
- 2 Bepaalde stukjes faag-DNA worden als vreemd herkend: de proto-spacers.
- 3 Een complex van Cas-eiwitten knipt uit het faag-DNA enkele proto-spacers.
- 4 Deze worden op de CRISPR-locus in het bacteriechromosoom geplakt en heten nu spacers.

- 5 Bij een volgend contact met faag-DNA, wordt op basis van deze spacers RNA gemaakt.
- 6 Dit spacer-RNA wordt opgeknipt in losse RNA's.
- 7 Deze RNA's binden aan complexen van Cas-eiwitten tot CRISPR-Cas.
- 8 CRISPR-Cas bindt aan de complementaire sequentie in het faag-DNA, waarna dat doorgeknipt wordt.

De CRISPR-locus bouwt zo na immunisatie een geheugen op van al het vreemde DNA dat in de bacterie terecht is gekomen. Is een binnengedrongen faag een 'oude bekende' van de bacterie, dan volgt snel een immuunreactie: het faag-DNA wordt herkend en afgebroken.

In een bacterie kunnen de volgende processen plaatsvinden:

- 1 translatie van Cas-RNA
- 2 transcriptie van CRISPR-DNA
- 3 translatie van faag-RNA

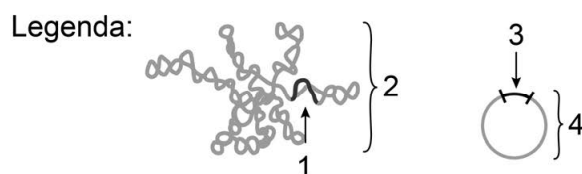
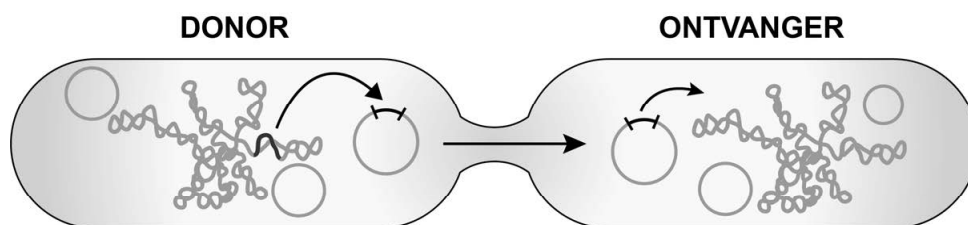
2p **20** Welk proces is of welke processen zijn essentieel voor de CRISPR-Cas-immuunreactie? Schrijf de nummers 1, 2 en 3 onder elkaar en noteer erachter of het betreffende proces **wel** of **niet** essentieel is.

Doordat bacteriën en hun fagen elkaar bestrijden, treedt co-evolutie op.

2p **21** Leg uit hoe selectiedruk deze co-evolutie veroorzaakt.

Het CRISPR-Cas-afweersysteem en de faag-spacers worden bij deling doorgegeven aan de volgende generatie bacteriën. Dit wordt verticale genoverdracht genoemd. De genoverdracht voor afweer kan ook horizontaal plaatsvinden door conjugatie. Na conjugatie geven de donor-spacers pas immuniteit aan de ontvangende bacterie na inbouw in de CRISPR-locus van deze bacterie. In afbeelding 4 is weergegeven hoe een melkzuurbacterie (donor) door conjugatie immuniteit doorgeeft aan een andere bacterie (ontvanger).

**afbeelding 4**



In de legenda van afbeelding 4 zijn vier delen genummerd.

2p **22** Schrijf de nummers 1 tot en met 4 onder elkaar en noteer de naam van het betreffende deel erachter.

De opheldering van het bacterieel immuunsysteem CRISPR-Cas is fundamenteel onderzoek waar zuivelbedrijven gebruik van kunnen maken. Met behulp hiervan kunnen zij hun melkzuurbacteriën beschermen tegen verschillende soorten fagen en zo voorkómen dat hun yoghurtcultuur eindigt als een waterige melk met klonten.

Drie suggesties voor een methode om een melkzuurbacterie te verkrijgen die immuun is voor meerdere soorten fagen zijn:

- 1 achtereenvolgens verschillende soorten fagen toedienen aan een bacteriestam die voor deze fagen nog niet immuun is
- 2 horizontale genoverdracht bevorderen tussen bacteriën met verschillende immuniteit voor deze fagen
- 3 met recombinant-DNA-techniek de CRISPR-locus van bacteriën uitbreiden met spacers van deze fagen

2p **23** Schrijf de nummers 1, 2 en 3 onder elkaar en noteer erachter of de betreffende methode **wel** of **niet** kan leiden tot een bacterie die voor meerdere soorten fagen immuun is.