



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0170863  
(43) 공개일자 2024년12월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/81 (2006.01) A23K 10/16 (2017.01)  
A23L 33/135 (2016.01) C12N 9/36 (2006.01)  
C12R 1/85 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 15/81 (2013.01)  
A23K 10/16 (2016.05)
- (21) 출원번호 10-2024-0067263  
(22) 출원일자 2024년05월23일  
심사청구일자 2024년05월23일
- (30) 우선권주장  
1020230068589 2023년05월26일 대한민국(KR)
- (71) 출원인  
고려대학교 산학협력단  
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자  
김경현  
서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호 (서초동, 삼풍아파트)
- 진용수  
미국 일리노이주 61822 샴페인 샌드힐 레인 3005 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인다나

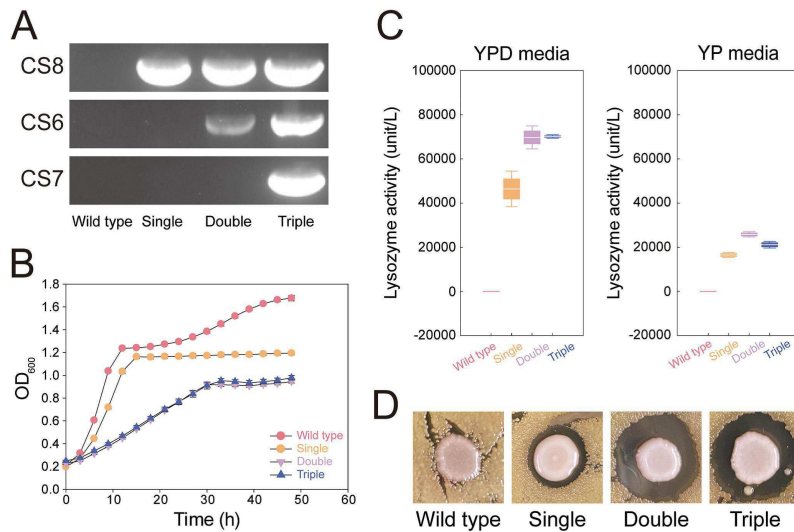
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 라이소자임을 분비하는 사카로마이세스 보울라디아이를 이용한 장내 균총 조절

(57) 요약

본 발명은 라이소자임을 분비하는 사카로마이세스 보울라디아이를 이용한 장내 균총 조절에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 마이크로바이옴의 구조 및 대사체를 조정하여 장내 환경을 개선함으로써 건강기능식품, 프로바이오틱스 또는 사료첨가제로 사용할 수 있는 라이소자임을 분비하는 재조합 사카로마이세스 보울라디아이를 제공하는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A23L 33/135* (2016.08)  
*C12N 9/2462* (2013.01)  
*C12Y 302/01017* (2013.01)  
*A23V 2002/00* (2023.08)  
*A23V 2200/3204* (2013.01)  
*C12N 2310/20* (2017.05)  
*C12R 2001/85* (2021.05)

**마이클 밀러**

미국 일리노이주 61822 샴페인 샌드힐 레인 3005

(72) 발명자

**김정연**

서울특별시 동대문구 신이문로8길 44, 2층(이문동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                    |
|-------------|------------------------------------|
| 과제고유번호      | 3210365                            |
| 과제번호        | 321036051SB010                     |
| 부처명         | 농림축산식품부                            |
| 과제관리(전문)기관명 | 농림식품기술기획평가원                        |
| 연구사업명       | 고부가가치식품기술개발                        |
| 연구과제명       | 마이크로바이옴 타겟 포스트바이오틱스 발굴 및 소재화 기술 개발 |
| 과제수행기관명     | 고려대학교 산학협력단                        |
| 연구기간        | 2023.01.01 ~ 2023.12.31            |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

인간 라이소자임을 코딩하는 유전자 및 닭의 라이소자임 분비 신호 서열로 형질전환된 재조합 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*).

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

재조합 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*)는 장내 마이크로바이옴(microbiome)의 구조 및 대사체를 변경하되,

상기 변경은 악커만시아 무시니필라(*Akkermansia muciniphila*)의 어번던스(abundance)의 증가; 및 락토바실러스(*Lactobacillus*), 블라우티아(*Blautia*) 및 클로스트리디움 센수 스트릭토(*Clostridium sensu stricto*) 1의 비율 감소 중 임의의 하나이고,

상기 대사체는 푸코스 및 N-아세틸글루코사민의 농도의 증가; 및 혈액 내 요소 및 과당 수치의 감소 중 임의의 하나인, 재조합 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*).

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

인간 라이소자임을 코딩하는 유전자는 SEQ ID NO: 1의 염기서열을 포함하는 재조합 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*).

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

닭의 라이소자임 분비 신호 서열은 SEQ ID NO: 2의 염기서열을 포함하는 재조합 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*).

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

형질전환은 CRISPR-Cas9 시스템 또는 재조합 벡터에 의해 이루어지는 것인 재조합 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*).

#### 청구항 6

제1항의 재조합 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*)를 포함하는 장내 환경 개선용 건강기능 식품.

## 청구항 7

제1항의 재조합 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)를 포함하는 프로바이오틱스 제제.

## 청구항 8

제1항의 재조합 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)를 포함하는 장내 환경 개선용 사료 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 라이소자임을 분비하는 사카로마이세스 보울라디아이를 이용한 장내 균총 조절에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 마이크로바이옴의 구조를 변화시켜 건강상의 이점을 유도하는 것을 목표로 하는 마이크로바이옴 공학은 식품 및 제약 산업에서 큰 주목을 받아왔다. 마이크로바이옴 공학은 주로 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 항생제, 마이크로바이옴 이식, 박테리오파지 등 5가지 방법을 통해 이루어지며 각각 장단점이 있다. 프로바이오틱스는 영양 경쟁, 항균 화합물 생산, 숙주 면역 조절을 통해 장내 마이크로바이옴에 영향을 미치지만 개인의 마이크로바이옴 변화를 예측하는 것은 어렵다. 프리바이오틱스는 바람직한 미생물의 선택적인 성장을 유도하지만, 마이크로바이옴의 변화와 그 결과를 합리적으로 예측하는 것은 어렵다. 항생제를 사용하면 많은 병원체를 포함한 장내 미생물을 죽일 수 있지만, 이로 인해 장내 미생물의 다양성이 낮아지고 클로스트리디옌(Clostridioides difficile)의 성장으로 2차 감염이 유발되며 항생제 내성 균주가 생성되는 등 잠재적으로 바람직하지 않은 변화가 발생한다. 장내 미생물군(microbiota) 이식은 클로스트리디옌(Clostridioides difficile) 감염의 재발을 예방하는 데 매우 효과적이지만, 그 메커니즘과 결과에 대한 이해가 부족하여 FDA는 이에 대해 경고하였다. 박테리오파지는 장의 특정 균주를 죽일 수 있는 잠재력을 가지고 있지만 많은 기술 발전과 규제 계약이 필요하다.

[0004] 마이크로바이옴을 의도된 구조로 미세 조정하기 위해 많은 연구자들은 "새시(chassis)"라고 불리는 유전자 변형된 프로바이오틱스의 사용에 중점을 두었다. 새시로서의 적합성을 결정하는 몇 가지 기준은 다음과 같다: (i) 새시 또는 그 대사 활동은 인간에게 부정적인 영향을 미쳐서는 안된다; (ii) 새시용 게놈 편집 도구가 잘 개발되어야 한다; (iii) 새시의 환경 저항은 위를 통과하기에 충분해야 한다; 및 (iv) 새시는 원하는 생리를 유도하기에 충분한 양의 표적 분자(단백질, 대사체 등)를 생성할 수 있어야 한다. 만성 질환을 치료하려면 새시의 집락화(colonization)가 필요할 수 있지만 장기간 집락화되면 자가면역 질환과 같은 부작용이 발생할 수 있다. 따라서 새시에는 짧은 체류 시간도 바람직하다.

[0005] 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)는 최근 마이크로바이옴 공학의 숙주로 사용되는 프로바이오틱 효모이다. 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)는 일반적으로 안전한 균주로 인정되어 오랫동안 장 질환 예방 및 치료를 위한 일반의약품으로 사용되어 왔다. 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)의 게놈 편집을 위해 개발된 기술이 거의 그대로 적용될 수 있다. 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)는 다른 많은 박테리아 및 효모에 비해 산도 및 체온과 같은 환경 스트레스에 대한 저항성이 매우 높은 것으로 보고되었으며 장에서 재조합 단백질을 분비할 수 있다. 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)는 경구 투여 중단 후 3~4일 이내에 장 밖으로 완전히 씻겨 나가므로 재조합 단백질의 공급을 쉽게 조절할 수 있다. 최근 연구에서는 유전자 조작된 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*) 또는 프로바이오틱 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)를 사용하여 염증성 장 질환을 치료하거나 클로스트리디옌(Clostridioides difficile)을 선택적으로 억제하기 위해 장에서 재조합 단백질을 생성함으로써 마이크로바이옴 공학의 잠재력이 입증되었다. 이러한 유망한 결과 외에도 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)를 이용한 마이크로바이옴의 전반적인 구조를 변화시키는 연구는 프로바이오틱 효모를 기반으로 한 새로운 마이크로바이옴 치료제 개발을 가능하게 할 것이다. 불행하게도 현재까지 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*) 투여가 정상 동물의 장내

마이크로바이옴을 어떻게 변화시키는지 조사한 연구는 없다. 또한 장에서 재조합 단백질을 분비하기 위해 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*)의 유전자를 조작하여 마이크로바이옴 구조를 변경하려는 연구는 없었다.

[0006] 표적 마이크로바이옴을 특정 구조로 변환하고 건강상의 이점을 유도하는 수단으로서 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*)를 사용하려면 두 가지 예비 연구가 필수적이다. 첫째, 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*) 또는 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*)가 분비하는 재조합 단백질의 투여로 인한 장내 마이크로바이옴의 변화를 규명할 필요가 있다. 그러나 야생형 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*) 투여 후 장내 마이크로바이옴 변화를 조사한 모든 연구에서 실험군은 질병이나 조직 손상 물질 및 항생제 치료와 같은 내재적이거나 유도된 본질적인 생리적 변화를 보였다. 따라서 이러한 변화가 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*) 투여에 의해서만 유발되었다고 결론짓기는 어려웠다. 또한, 이전 연구에서는 단거리서열분석을 수행하였는데, 이는 낮은 해상도로 인해 속(genus) 식별을 어렵게 만든다. 결과적으로 대부분의 연구에서는 문(phylum)이나 과(family) 수준에서만 변화가 보고되었다. 더 중요한 것은 아직까지 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*)를 통해 재조합 단백질을 생산하여 장내 미생물을 변화시키는 연구는 없다는 점이다.

[0007] 둘째, 장에서 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*)가 분비하는 재조합 단백질을 정량화하는 것이 필요하다. 현재까지 여러 연구에서 유전자 조작된 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*)를 사용하여 장에서 재조합 단백질을 생산하고 녹색 형광 단백질(GFP) 또는 mCherry의 발현을 통해 장에서 재조합 단백질의 존재를 검증한 것으로 보고되었다. 이전 결과와 함께 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*)가 분비하는 재조합 단백질을 장에서 정량화할 수 있다면 치료 단백질의 역가를 예측하고 그에 따른 숙주 생리학적 변화를 예측하는 것이 가능할 수 있다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) 1. Sheth RU et al., Trends Genet 32:189-200, 2016.  
 (비특허문헌 0002) 2. Inda ME et al., Trends Immunol 40:952-973, 2019.  
 (비특허문헌 0003) 3. Palma ML et al., Appl Microbiol Biotechnol 99:6563-6570, 2015.  
 (비특허문헌 0004) 4. Liu J-J et al., Appl Environ Microbiol 82:2280-2287, 2016.  
 (비특허문헌 0005) 5. Bagherpour G et al., Front Microbiol 9:723, 2018.  
 (비특허문헌 0006) 6. Chen K et al., Sci Transl Med 12:eaax4905, 2020.  
 (비특허문헌 0007) 7. Duysburgh C et al., Benef Microbes 12:59-73, 2021.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 인간 라이소자임을 분비하는 유전자 조작된 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*)를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 유전자 조작된 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*)의 장내 환경 개선 위한 건강기능식품, 프로바이오틱스 또는 사료첨가제로서의 용도를 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인간 라이소자임을 코딩하는 유전자 및 닭의 라이소자임 분비 신호 서

열로 형질전환된 재조합 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)를 제공한다.

- [0014] 본 발명은 또한 상기 재조합 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)를 포함하는 장내 환경 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한 상기 재조합 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)를 포함하는 프로바이오틱스 제제를 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한 상기 재조합 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)를 포함하는 장내 환경 개선용 사료 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0018] 본 발명은 인간 라이소자임을 분비함으로써 장내 마이크로바이옴의 구조 및 대사체를 변경하는 재조합 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)를 제공하는 효과가 있다.
- [0019] 본 발명은 또한 유전자 조작된 상기 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)로부터 분비되는 라이소자임을 정량화할 수 있고, 미생물 공학을 위한 새시로 사용하는데 필수적인 정보를 제공하여 건강기능식품, 프로바이오틱스 제제 또는 사료첨가제로 활용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 인간 라이소자임을 분비하는 재조합 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)의 구축 도면이다: (A) 단일, 이중 및 삼중 카피 균주 구축을 위해 닭의 분비 신호와 함께 인간 라이소자임 유전자를 CS6, CS7 및 CS8 부위에 삽입한 결과; (B) 37℃의 YPD 배지에서 야생형 및 조작된 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)의 성장 곡선; (C) 마이크로코커스 리소데이키티쿠스(*Micrococcus lysodeikticus*)의 용해 속도를 사용하여 측정된 라이소자임 활성; (D) 할로(halo) 분석을 사용하여 측정된 라이소자임 활성.
- 도 2는 마우스 실험 개요를 나타낸다: (A) 실험의 개략도; (B) 경구 위관영양(oral gavage) 기간 동안 마우스의 무게; (C) 배설물 샘플의 효모 CFU; (D) 장 내용물의 라이소자임 및 효모 CFU의 양.
- 도 3은 마이크로바이옴의 전반적인 변화를 나타낸다: (A) 알파 다양성; (B) 문(phyla)의 상대적 어번던스; (C) 피르미쿠테스(*Firmicutes*)/박테로이도타(*Bacteroidota*) 비율.
- 도 4는 PBS 그룹과 SB 그룹 사이의 분변 마이크로바이옴을 비교한 결과이다: (A) 1,331개의 ASV를 사용하는 PCoA; (B) 1,331개의 ASV를 사용하는 HCA; (C) 14일차에 SB와 PBS 그룹 사이에 ASV가 크게 변경되었음을 제안하기 위한 볼케이노 플롯.
- 도 5는 SB와 SBLys 사이의 분변 마이크로바이옴을 비교한 결과이다: (A) PBS, SB 및 SBLys 간의 비교에서 크게 변경된 86개의 ASV를 사용한 HCA; (B) 14일차에 SB와 SBLys 사이에 크게 변경된 ASV를 제안하기 위한 볼케이노 플롯
- 도 6은 대사체 및 생화학적 대사의 변화를 나타낸다: (A) 크게 변화된 15가지 분변 대사체를 사용한 HCA; (B) 장내 마이크로바이옴에서 크게 변화된 생화학적 대사를 제안하기 위해 크게 변화된 15개의 분변 대사체를 사용한 MSEA; (C) 크게 변화된 5가지 혈청 대사체를 사용한 HCA; (D) 숙주에서 크게 변화된 생화학적 대사를 제안하기 위해 크게 변화된 5개의 혈청 대사체를 사용한 MSEA.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 프로바이오틱 효모 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)는 환경 스트레스에 대한 높은 저항성, 잘 발달된 유전 도구 및 장에서 재조합 단백질을 분비하는 능력으로 인해 마이크로바이옴 공학을 위한 새시로 사용할 수 있는 큰 잠재력을 가지고 있다. 또한, 라이소자임의 경구 공급이 장내 마이크로바이옴과 배설물 대사체를 변화시키는 것으로 보고됨에 따라 본 발명자들은 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)를 미생물 공학의 새시로 사용하기 위한 기본 정보를 제공하기 위해 (i) 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)는 Cas9 기반 게놈 편집을 통해 인간 라이소자임을 분비하도록 유전자 조작하고; (ii) 숙 및 계통 수준에서 높은 정확도의 장거리서열분석(long-read sequencing)을 사용하여 건강한 쥐에서 사



사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*) 투여로 인한 장내 미생물의 변화를 조사하며; (iii) 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)에 의해 생성된 재조합 단백질의 장 수준을 정량화하고 생쥐의 장내 미생물에 대한 재조합 단백질의 효과를 조사하고; 및 (iv) 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)(SB) 또는 재조합 단백질을 생산하는 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)(SBLys)를 투여한 생쥐의 분변 및 혈청 대사체의 변화를 조사하였다.

- [0023] 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*) 투여 결과, 장에서 조작된 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)가 분비한 재조합 단백질이 클로스트리디아(*Clostridia*)의 성장을 촉진하고 균주의 다양성을 증가시켜 장내 마이크로바이옴의 구조를 변화시켰다. 장에서 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)가 분비하는 인간 라이소자임은 선택적 성장을 통해 독특한 장내 미생물 구조를 가져왔다. 또한, 프로바이오틱 효모 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)의 투여는 숙주 에너지 대사에 영향을 미치고 혈액 요소 및 과당 수치를 감소시켜 생쥐의 건강상의 이점 메커니즘을 시사한다. 이 결과는 장내 마이크로바이옴과 숙주 생리학을 변화시키는 조작된 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)를 사용한 치료법 개발에 귀중한 정보를 제공한다.
- [0024] 따라서, 본 발명은 인간 라이소자임을 코딩하는 유전자 및 닭의 라이소자임 분비 신호 서열로 형질전환된 재조합 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)에 관한 것이다.
- [0025] 상기 재조합 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)는 장내 마이크로바이옴(microbiome)의 구조 및 대사체, 특히 분변의 대사체를 변화시킨다.
- [0026] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 재조합 균주로부터 분비된 라이소자임은 주로 맹장 및 대장에서 검출되며, PBS 및 야생형 SB에 의한 마이크로바이옴 구조와 비교하여 상이한 미생물 구조를 나타낸다. 도 5A에서와 같이, SB 투여에 의해 증가된 많은 미생물의 어번던스는 SBLys(ASV 클러스터 3) 및 PBS에서와 유사하게 유지되었지만 일부 미생물은 SBLys(ASV 클러스터 2)에서만 증가한다. 이는 장내 SBLys에 의해 분비되는 라이소자임이 라이소자임에 민감한 미생물의 성장을 억제할 때 라이소자임에 민감한 미생물의 성장의 결과일 수 있다. 흥미롭게도, SBLys 투여는 악커만시아 무시니필라(*Akkermansia muciniphila*)의 어번던스(abundance)를 유의하게 증가시켰고, 이는 SB 투여에 의해 유의하게 감소된다. 또한, 락토바실러스(*Lactobacillus*), 블라우티아(*Blautia*) 및 클로스트리디움 센수 스트릭토(*Clostridium sensu stricto*) 1의 비율을 감소시킨다.
- [0027] 또한, 재조합 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)는 숙주의 에너지 대사에 영향을 미치며, 푸코스, N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 등의 농도를 증가시킬 수 있다. 아울러, 직접 또는 간접적으로 혈액 내 요소와 과당 수치를 감소시킬 수 있다. 이러한 변화는 프로바이오틱 효모 투여 자체의 영향이나 유도된 마이크로바이옴 변화로 인한 것일 수 있다. 예컨대, 프로바이오틱 효모 투여에 의해 증가된 블라우티아(*Blautia*), 라크노스피라세(*Lachnospiraceae*), 락토바실러스 존스니(*Lactobacillus johnsonii*)(도 4C 및 5A)는 잠재적 프로바이오틱스로 간주되며, 유익 미생물의 선택적인 성장은 에너지 대사의 변화와 혈액 요소 및 당 수준의 저하에 기여할 수 있다(도 6D 참조).
- [0028] 따라서, 본 발명의 재조합 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)는 장내 환경을 개선하는 건강기능식품, 프로바이오틱스 제제 또는 동물 사료첨가제로 활용할 수 있다.
- [0029] 상기 인간 라이소자임을 코딩하는 유전자는 SEQ ID NO: 1의 염기서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 상기 닭의 라이소자임 분비 신호 서열은 SEQ ID NO: 2의 염기서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 상기 형질전환은 CRISPR-Cas9 시스템 또는 재조합 벡터에 의해 이루어질 수 있다.
- [0032] 상기 형질전환은 인간 라이소자임을 코딩하는 유전자 및 닭의 라이소자임 분비 신호 서열이 야생형 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)의 게놈 내 유전자사이 지역(intergenic region) CS6, CS7 및 CS8 중 어느 하나에 혼입되는 것일 수 있다.
- [0033] 상기 "재조합 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 인 비보(*in vivo*) 또는 인 비트로(*in vitro*)에서 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물(construct)을 말한다. 본 명세서에 있어서, 용어 "플라스미드", "벡터" 또는 "발현 벡터"는 상호 교환적으로 사용된다.
- [0034] 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 또는 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제

한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택마커를 포함하고, 복제가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.

[0035] 상기 "작동가능하게 연결된"은 적절한 핵산 분자가 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 것을 의미한다.

[0036] 본 명세서에서, 용어 "핵산 분자"는 cDNA, genomic DNA, 합성 DNA 또는 RNA, PNAS 또는 LNA 기원의 임의의 단일 또는 이중 나선 핵산 분자, 또는 이들의 혼합물을 의미한다. "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명의 재조합 벡터는 바람직하게는 일반적인 대장균 균주 발현용 벡터에 상술한 유전자를 삽입함으로써 제조될 수 있다. 상기 대장균 균주 발현용 벡터는 일반적으로 사용할 수 있는 모든 대장균 발현용 벡터가 제한 없이 사용될 수 있다.

[0038] 또한, 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다. 예컨대, 상기 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)의 형질 전환을 위해 플라스미드와 같은 재조합 벡터를 사용하는 경우, 영양 요구성 돌연변이, 예를 들면 *HIS3*, *TRP1* 및 *URA3* 유전자 중 하나 이상이 비활성화된 돌연변이 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*) 균주를 사용할 수 있다. 바람직하게는, 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 숙주세포는 인간 라이소자임을 분비하는 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)이다.

[0039] 상기 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘( $\text{CaPO}_4$ ) 침전, 염화칼슘( $\text{CaCl}_2$ ) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0040] 형질전환체의 (대량) 배양을 위해, 다양한 배양 방법이 적용될 수 있는데, 예컨대 재조합 미생물로부터 발현 또는 과발현된 유전자 산물의 대규모 제조는 회분(batch) 또는 연속 배양 방법에 의해 달성될 수 있다. 회분 및 유가식(fed-batch) 배양 방법은 통상적인 것으로서 당분야에 공지되어 있다. 연속 배양 공정을 위한 영양분 및 성장 인자의 조절 방법, 뿐만 아니라 생성물 형성율을 최대화 하기 위한 기법은 미생물 산업 분야에 공지되어 있다. 또한, 배양배지로는 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄로 구성된 배지를 사용할 수 있으며, 당분야에 공지된 바에 따라 구성할 수 있다.

[0042] 본 발명은 또한 상기 재조합 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)를 포함하는 장내 환경 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0043] 본 발명의 건강기능식품은 영양보조제, 건강식품 및 식품 첨가제 등의 모든 형태를 포함하고, 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 예를 들면, 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 본 발명의 28-7 균주의 바람직한 함유량으로는 식품의 전체 중량에 대해 약 1 내지 100 중량%를 포함할 수 있다.

[0045] 본 발명은 또한 상기 재조합 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)를 포함하는 프로바이오틱스 제제를 제공한다.

[0046] 상기 프로바이오틱스 제제는 당업계에 공지된 방법에 따라 다양한 제형과 방법으로 제조 및 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 재조합 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)는 약제학적 분야에서 통상적으로 사용되는 담체와 혼합하여 산제(powder), 액제(liquids and solutions), 정제(tablet), 캡슐(capsule), 시럽(syrup), 현탁제(suspension) 또는 과립제(granule) 등의 형태로 제조되어 투여될 수 있다. 상기 담체로는 예를 들어, 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 및 향료 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 투여 용량은 체내에서의 활성 성분의 흡수도, 불활성물, 배설속도, 피투여



자의 연령, 성별, 축종, 상태 및 질병의 중증 정도 등에 따라 적절히 선택할 수 있다.

- [0048] 본 발명은 또한 상기 재조합 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)를 포함하는 장내 환경 개선용 사료 조성물을 제공한다.
- [0049] 본 발명의 사료 조성물은 동물의 기초사료에 일정 비율로 첨가할 수 있다. 상기 기초사료는 주성분이 옥수수, 대두박, 유청, 어분, 당밀, 소금, 비타민 프리믹스 및 미네랄 프리믹스 등으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 비타민 프리믹스는 비타민 A, 비타민 D, 비타민 E, 리보프라빈 및 나이아신으로 구성될 수 있으며, 미네랄 프리믹스는 망간, 철아연, 칼슘, 구리, 코발트 및 셀레늄 등으로 구성될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 사료 조성물 중의 상기 재조합 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)의 함량은 급여 동물의 종, 주령, 체중, 및 사육 조건 등에 따라 적절히 선택될 수 있다. 본 발명의 사료 조성물에 있어서, 상기 동물은 쥐, 생쥐 또는 가축 등의 포유동물 등 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 사료 조성물은 기술 분야에 공지된 사료 제조방법에 따라 제조될 수 있으며, 예를 들어, 각종 사료 원료 또는 배합사료와 본 발명의 상기 균주를 혼합한 후, 추가적인 가공 공정, 예를 들어 펠렛 형태로의 성형 또는 과립 등의 형태로의 절단 단계 등을 더 수행함으로써 제조될 수 있다. 본 발명의 사료 조성물의 구성성분, 조성, 제조방법, 급여방법 등은 기술분야에 공지된 통상의 기술로부터 적절히 선택될 수 있음이 통상의 기술자에게 명백하다.
- [0051] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0052] <실시예 1> 인간 라이소자임 분비를 위한 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)의 구축
- [0053] (균주 및 플라스미드 구축)
- [0054] 플라스미드 증식을 위해 대장균(*Escherichia coli*) Top10을 사용하였다. 대장균(*Escherichia coli*) 가이드 RNA 플라스미드 형질전환과 15 mg의 공여자 DNA를 상동 재조합에 사용하였다. 효모 콜로니 PCR을 사용하여 게놈 혼입을 확인하였다. 항생제 마커가 포함된 플라스미드로 형질전환된 효모 균주를 해당 항생제가 보충된 YPD 한천 플레이트에서 증식시켰다. 세포를 Luria-Bertani 배지(LB; 5 g/L 효모 추출물, 10 g/L 트립톤 및 10 g/L NaCl)에서 37°C에서 배양하고 선택을 위해 암피실린(100 g/L)을 첨가하였다. 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*) ATCC MYA-796이 본 실험에 사용되었다. 효모 배양을 위한 배지로는 YPD를 사용하였다. 안정적인 발현을 위해 인간 라이소자임 유전자를 닭의 라이소자임 신호 서열(cHLY)과 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)의 게놈에 혼입하기 위해 가이드 플라스미드 p42H-CS6, p42K-CS7, p42K-CS8 및 플라스미드 p426-pGPD-cHLY가 사용되었다(표 1). pGPD-cHLY를 포함하는 DNA 단편을 프라이머 CS6-IU 및 CS6-ID, CS7-IU 및 CS7-ID, CS8-IU 및 CS8-ID(표 1)를 사용하여 p426-GPD-cHLY로부터 증폭시키고 CRISPR-Cas9 기반 게놈 혼입을 위해 공여자 DNA로 사용하였다. CS6-CKU 및 CS6-CKD, CS7-CKU 및 CS7-CKD, CS8-CKU 및 CS8-CKD 프라이머(표 1)는 cHLY의 올바른 혼입을 위한 진단 PCR에 사용되었다. 효모 세포의 형질전환은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-LiAc 방법으로 수행되었다(Liu J-J et al., Appl Environ Microbiol 82:2280-2287 참조). 그런 다음 Cas9 또는 가이드 RNA 플라스미드 형질전환을 위해 3 mg의 DNA를 사용하고 상동 재조합을 위해 15 mg의 공여자 DNA를 사용하였다. 효모 콜로니 PCR을 사용하여 게놈 혼입을 확인하였다. 항생제 마커가 포함된 플라스미드로 형질전환된 효모 균주를 해당 항생제가 보충된 YPD 한천 플레이트에서 증식시켰다.

### 표 1

- [0055] 본 발명에 사용된 프라이머, 플라스미드 및 균주

| 프라이머    | 프라이머 서열(5'-3')                                                          | 출처   |
|---------|-------------------------------------------------------------------------|------|
| CS6-IU  | aacctcgaggagaagttttttaccctctccacagatccaggaaacagctatgaccatg              | (1)  |
| CS6-ID  | taattaggttagaccgggtagatttttccgtaaccttggtgtctgtaaaacgacggccagt           | (1)  |
| CS6-CKU | gtctgccgaaattctgtg                                                      | (1)  |
| CS6-CKD | cggtcagaaagggaatg                                                       | (1)  |
| CS7-IU  | tcgaaatttgttagatgccccgaataaatagtaactttatttagggaaagaattaaccctcactaaaggga | 본 발명 |

|                                                                                                                                                                           |                                                                                |                               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| CS7-ID                                                                                                                                                                    | gtgatggcgaaatgggtcttttactaagtacatgctaaaatatggcgtgag<br>taatacgactcactatagggc   | 본 발명                          |
| CS7-CKU                                                                                                                                                                   | gtattgtgacgcgttttcc                                                            | 본 발명                          |
| CS7-CKD                                                                                                                                                                   | cctcccaactacatcttga                                                            | 본 발명                          |
| CS8-IU                                                                                                                                                                    | caaaattacctacggttaattagttaaaggccaaaatctaattgttacaataa<br>attaacc ctcactaaaggga | (2)                           |
| CS8-ID                                                                                                                                                                    | gaccgttcccttgtgtgtaccagtggtagggttcttctcggtagcttctg<br>taatac gactcactatagggc   | (2)                           |
| CS8-CKU                                                                                                                                                                   | agtgaacatagaagggg                                                              | (2)                           |
| CS8-CKD                                                                                                                                                                   | taagcagcccagtgaaac                                                             | (2)                           |
| 플라스미드                                                                                                                                                                     |                                                                                |                               |
| p426-pGPD-cHLY                                                                                                                                                            | pRS426-pTDH3-cHLY-tCYC1                                                        | (2)                           |
| Cas9-NAT                                                                                                                                                                  | p414-TEF1p-Cas9-CYC1t-NAT1                                                     | Addgene plasmid<br>64329; (3) |
| 균주                                                                                                                                                                        |                                                                                |                               |
| <i>S. boulardii</i> ATCC<br>MYA-796                                                                                                                                       |                                                                                | ATCC                          |
| S.b (Lysozyme;<br>single copy)                                                                                                                                            | CS8-cHLY                                                                       | (2)                           |
| S.b (Lysozyme;<br>double copy)                                                                                                                                            | CS8-cHLY, CS6-cHLY                                                             | 본 발명                          |
| S.b (Lysozyme;<br>triple copy)                                                                                                                                            | CS8-cHLY, CS6-cHLY, CS7-cHLY                                                   | 본 발명                          |
| 1. Kwak S et al., Biotechnol Bioeng 114:2581-2591.<br>2. Liu J-J et al., Appl Environ Microbiol 82:2280-2287.<br>3. Zhang G-C et al., Appl Environ Microbiol 80:7694-7701 |                                                                                |                               |

[0056] (인간 라이소자임의 정량화)

[0057] 인간 라이소자임의 양은 인간 라이소자임 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA) 키트(ab267798, Abcam)를 사용하여 측정하였다. 간단히 말하면, 50 mL의 표준물질 또는 시료를 96웰에 첨가하였다. 그런 다음 50 mL의 항체 각테일을 모든 웰에 첨가하였다. 혼합물이 들어 있는 96-웰을 30℃에서 1시간 동안 배양한 후 350 mL의 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 다음으로, 3,39,5,59-테트라메틸벤지딘 전개액 100 mL를 각 웰에 첨가하고 실온에서 15분간 배양하였다. 마지막으로 각 웰에 정지 용액 100 mL를 첨가하고 450 nm와 600 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다. 인간 라이소자임 ELISA 키트에 포함된 라이소자임 용액을 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ng/mL로 희석하여 표준물질로 사용하였다(n=2).

[0058] 효모 배양물로부터 인간 라이소자임을 정량화하기 위해 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)의 야생형 및 조작된 균주를 15 mL 배양 튜브의 5 mL YPD 배지에서 24시간 동안 사전 배양하였다. 전배양된 세포를 21,130xg에서 5분간 4℃에서 원심분리하고 증류수로 세척하였다. 세척 과정은 3번 반복되었다. 세척된 세포를 72시간 동안 15 mL 배양 튜브의 5 mL YPD에 접종하였다(초기 OD50.2). 4℃에서 5분 동안 21,130xg로 원심분리한 후 상등액 50 mL를 인간 라이소자임의 정량화에 사용하였다.

[0059] 장 내용물로부터 인간 라이소자임의 정량화를 위해 맹장 및 대장 내용물 50 mg을 PBS 완충액 500 mL와 혼합하였다. 멸균 루프를 사용하여 장 내용물을 작은 입자로 분해하였다. 장 내용물과 PBS의 혼합물을 10분 동안 격렬하게 와류시켰다. 이어서, 혼합물을 21,130xg에서 4℃에서 20분 동안 원심분리하였다. 인간 라이소자임의 정량화를 위해 상등액 50 mL를 사용하였다.

[0060] (마우스 실험)

[0061] 프로젝트 프로토콜 21028의 동물 사용은 국립보건원(National Institutes of Health) 지침에 따라 2021년 3월 5일 일리노이주 동물보호기관 및 사용위원회의 승인을 받았다. 마우스는 Jackson Laboratory에서 구입하여 일리노이 대학교 Urbana-Champaign의 Carl R. Woese Genomic Biology Institute의 동물 시설에서 관리되었다. 6주령 C57BL/6 수컷 마우스를 먹이 환경에서 12시간의 명암 주기 하에 유지하였다. 마우스를 AIN93M 펠릿 식이(F3155, Bio-Serv)에 1주 동안 적응시켰다. 생쥐는 3마리씩 그룹으로 나누어 수용되었다. 케이지를 매일 교체하고, 각 마우스의 체중을 측정하며, 배설물 샘플을 수집하였다.

- [0062] (생쥐의 장내 인간 라이소자임 측정)
- [0063] 조작된 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*)가 장에서 분비하는 인간 라이소자임을 정량하기 위해 각 그룹(SB 및 SBLys)에서 3마리의 마우스를 사용하였다. PBS 완충액(SB 또는 SBLys[3x10<sup>8</sup> CFU]를 함유하는 100 mL PBS 완충액)을 각 마우스에 5일 동안 매일 경구 투여하였다. 마지막 경구 위관영양 공급 2시간 후, 마우스를 희생시키고, 장 내용물을 수집하였다.
- [0064] (생쥐의 장내 미생물 조사)
- [0065] SB 또는 SBLys 투여 후 마이크로바이옴의 변화를 조사하기 위해 각 그룹에서 8마리의 마우스를 사용하였다. 100 mL의 PBS 또는 효모 세포(3x10<sup>8</sup> CFU)를 함유하는 PBS를 각 마우스에 14일 동안 매일 경구 투여하였다. 마지막 경구 위관영양 1일 후, 마우스를 희생시키고, 혈청 및 장 내용물을 수집하였다. 경구 위관영양 동안 상당한 체중 감소로 인해 SB의 마우스 2마리와 SBLys의 마우스 1마리가 희생되었다.
- [0066] (분변 샘플에서 게놈 DNA 추출)
- [0067] QIAamp Fast DNA 분변 미니키트(51604, Qiagen Sciences)를 사용하여 분변 샘플에서 게놈 DNA를 추출하였다. 분변(50 mg)을 얼음 위의 2 mL 미세원심분리 튜브에서 1 mL의 InhibitEX 완충액과 혼합하였다. 분변은 멸균 루프를 사용하여 작은 입자로 분해되었다. 혼합물이 담긴 튜브를 5분 동안 와동시킨 후 70°C에서 5분 동안 가열하였다. 튜브를 1분 동안 다시 와동시키고 4°C에서 5분 동안 21,130g에서 원심분리하였다. 상등액(600 mL)을 25 mL 단백질을 분해효소 K가 들어 있는 새로운 2 mL 미세원심분리 튜브로 옮겼다. 완충액 AL(600 mL)을 혼합물에 첨가하였다. 그런 다음 혼합물을 70°C에서 10분간 배양한 다음 순수 에탄올 600 mL와 혼합하였다. 혼합물을 10초 동안 와동시킨 후 QIAamp 스핀 컬럼으로 옮겼다. 컬럼을 4°C에서 1분 동안 21,130xg로 원심분리하였다. 모든 용해물을 QIAamp 스핀 컬럼에 로딩한 후, 완충액 AW1 500 mL를 첨가하고 4°C에서 1분간 21,130 x g로 원심분리하였다. 다음으로, 500 mL의 완충액 AW2를 첨가하고 4°C에서 3분 동안 21,130xg에서 원심분리하였다. 스핀 컬럼을 새로운 2 mL 수집 튜브에 넣고 4°C에서 3분간 21,130g으로 원심분리하였다. 마지막으로 스핀 컬럼을 새로운 1.5 mL 미세원심분리 튜브로 옮기고 200 mL 완충액 ATE를 첨가하였다. 실온에서 1분 동안 배양한 후, 컬럼을 4°C에서 1분 동안 21,130xg에서 원심분리하여 DNA를 용출하였다. 추출된 게놈 DNA는 추가 분석이 있을 때까지 280°C에서 보관되었다.
- [0068] (효모 CFU 계산)
- [0069] 생존 가능한 효모 세포를 계산하기 위해 분변 또는 맹장 및 대장 내용물 20 mg을 PBS 완충액 1 mL와 혼합하였다. 멸균 루프를 사용하여 분변을 작은 입자로 분해하고 5분 동안 와류시켰다. 적절한 수준의 CFU에 도달할 때까지 혼합물을 PBS로 희석하였다. 희석된 혼합물(200 mL)을 클로람페니콜(50 mg/L)을 함유한 Sabouraud 텍스트로스 한천에 뿌렸다. 콜로니가 없는 경우를 로그 스케일로 표현하기 위해 모든 결과값에 1을 더하여 로그로 변환하였다.
- [0070] (16S rRNA 유전자 장거리서열분석)
- [0071] PacBio Sequel IIe의 라이브러리 구성 및 시퀀싱은 일리노이 대학교 Urbana-Champaign의 Roy J. Carver 생명공학 센터에서 수행되었다. 16S 앰플리콘은 프로토콜에 따라 Pacific Biosciences의 바코드가 있는 전체 길이 16S 프라이머를 사용하여 생성되었다. 정방향 및 역방향 16S 서열은 5'-AGRGTTYGATYMTGGCTCAG-3' 및 5'-RGYTACCTTGTTACGACTT-3'이다. 개별적으로 바코드가 표시된 앰플리콘은 풀링되었으며 SMRTbell Express 템플릿 준비 키트 2.0을 사용하여 라이브러리로 변환되었다. 라이브러리는 Qubit을 사용하여 정량화되었으며 단편 분석기(Agilent)에서 실행되어 예상 크기의 DNA 단편이 존재하는지 확인하였다. 라이브러리는 PacBio Sequel IIe의 SMRTcell 8M에서 12시간의 무비 시간으로 시퀀싱되었다. 순환 합의 분석은 ccs min-passes 3 -min-rq 0.999의 매개변수와 함께 SMRTLink V10.1을 사용하여 수행되었다. -ccs -different -split-bam-named의 매개변수를 사용하여 lima 소프트웨어를 사용하여 역다중화를 수행하였다. 16S rRNA 데이터는 기본 매개변수(34)를 사용하여 DADA2 파이프라인(버전 1.20.0)을 사용하여 전처리되었다. Silva 라이브러리(버전 138.1)는 박테리아의 분류학적 식별에 사용되었다(Quast C et al., Nucleic Acids Res 41:D590-596; Yilmaz P et al., Nucleic Acids Res 42:D643-648 참조).
- [0072] (GC-MS를 이용한 분변 및 혈청 대사체 분석)
- [0073] 분변에서 대사체를 추출하기 위해 14일차에 수집된 분변 샘플 약 50 mg의 무게를 측정하고 1.7 mL 미세원심분리 튜브에 넣었다. 최종 농도가 300 mg/mL가 되도록 증류수를 첨가한 후 멸균 루프를 사용하여 분변을 작은 입자로

분해하였다. 혼합물을 10분 동안 격렬하게 와동시키고 4℃에서 20분 동안 21,130 g에서 원심분리하였다. 다음으로, 상등액 10 mL를 새로운 1.7 mL 미세원심분리 튜브로 옮기고 모든 용매가 증발할 때까지 Speed-Vac에서 감압 건조하였다. 혈청에서 대사체를 추출하기 위해 혈청 100 mL를 순수 메탄올 900 mL와 혼합하고 10분간 격렬하게 볼텍싱하였다. 4℃에서 20분 동안 21,130xg로 원심분리한 후, 상등액 500 mL를 새로운 1.7 mL 미세원심분리 튜브로 옮기고 모든 용매가 증발할 때까지 Speed-Vac에서 감압 건조하였다.

[0074] GC-MS를 사용하여 대사체를 식별하고 정량화하기 위해 메톡시화 및 실릴화를 수행하였다. 메톡시화를 위해 피리딘(360570, Sigma-Aldrich)에 용해된 40 mg/mL 메톡시아민 염산염(226904, Sigma-Aldrich) 10 mL를 대사체가 들어 있는 튜브에 첨가하고 혼합물을 30℃에서 90분 동안 인큐베이션하였다. 실릴화를 위해 N-메틸-N-트리메틸실릴-트리플루오로아세트아미드(69479, Sigma-Aldrich) 50 mL를 혼합물에 첨가하고 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다.

[0075] 대사체 분석에는 사중극자 MS5975C 시스템(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)과 결합된 Agilent 7890A GC가 사용되었다. 유도체화된 샘플의 1.0 mL 분취량을 비분할 모드로 GC에 주입하였다. 대사체는 추가 10 m 가드 컬럼이 있는 RTX-5Si1 MS 컬럼(길이 30 m, 내경 0.25 mm, 필름 두께 0.25 mm, Restek)에서 분리되었다. 초기 오븐 온도는 50℃에서 1분 동안 설정하고, 20℃/분의 속도로 330℃까지 올리고, 330℃에서 5분 동안 유지하였다. 질량 스펙트럼은 85-550 m/z의 질량 범위에 걸쳐 기록되었다. 샘플은 70 eV에서 전자 충격을 통해 이온화되었다. GC-MS 데이터 처리를 위해 MS 다이얼(버전 4.24)이 사용되었다(Tsugawa H et al., Nat Methods 12:523-526 참조). MS-DIAL에서 제공하는 Fiehn RI 라이브러리(Kind T et al., Anal Chem81:10038-10048; Lai Z et al., Nat Methods 15:53-56 참조)의 최신 All 기록을 사용하여 피크의 질량 스펙트럼을 일치시켜 대사체를 확인하였다.

[0076] (통계 분석)

[0077] 마이크로바이옴 데이터의 통계적 분석을 위해 MicrobiomeAnalyst(<https://www.microbiomeanalyst.ca/MicrobiomeAnalyst>)가 사용되었다(Chong J et al., Nat Protoc 15:799-821 참조). 각 비교에서는  $\geq 2$  개수의 ASV만 데이터 분석에 사용되었다. 낮은 카운트 필터와 낮은 분산 필터는 사용되지 않았다. 각 샘플의 ASV 합계는 100으로 조정되었다. 알파 다양성 계산에는 다음 기준이 사용되었다(원본 데이터, Shannon 다양성 및 Mann-Whitney/Kruskal-Wallis). PCoA(Bray-Curtis Index, 기능 수준 및 순열 MANOVA)에는 다음 기준이 사용되었다. HCA 유클리드 거리에는 와드 클러스터링이 사용되었다; 와드 클러스터링. ASV 간의 상관 관계는 Python(버전 3.8)에서 SciPy 패키지의 Spearman 순위 함수를 사용하여 계산되었다. MetaboAnalyst(<https://www.metaboanalyst.ca/>; 버전 5.0)는 대사체 데이터의 통계 분석에 사용되었다(Pang Z et al., Nat Protoc 17:1735-1761 참조). 대사체 정규화에는 자동 크기 조정이 사용되었다.

[0078] 이전 연구에서 본 발명자들은 Cas9 기반 게놈 편집을 통해 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*) 게놈의 유전자사이 지역(intergenic region; CS8 지역)에 닭의 라이소자임 분비 신호와 함께 인간 라이소자임 유전자를 혼입하였다. 장내 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*)의 대사 활동은 매우 풍부한 박테리아에 의해 제한될 수 있으며, 단일-커피 혼입된 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*)에 의해 분비되는 인간 라이소자임의 양은 장내 마이크로바이옴의 변화를 유도하기에 충분하지 않을 수 있다. 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*)의 라이소자임 생산 능력을 증가시키기 위해 Cas9 기반 게놈 편집을 사용하여 인간 라이소자임 발현 카세트를 CS6, CS7 및 CS8의 유전자사이 지역에 혼입하였다(표 1 참조). 라이소자임 발현 카세트의 단일, 이중 및 삼중 카피로 조작된 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*) 균주가 구축되었다(도 1A). 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*)의 야생형 및 조작된 균주를 효모 추출물-펩톤-텍스트로스(YPD; 10g/L 효모 추출물, 20g/L 펩톤 및 20g/L 포도당) 배지에서 37℃에서 배양하고, 그들의 성장율을 측정하였다(도 1B). 야생형과 비교하여 조작된 균주는 10시간 후 상당히 낮은 성장률과 최종 세포 밀도를 나타냈지만 이중-커피 균주와 삼중-커피 균주 간에는 유의한 차이가 없었다. 이중 단백질의 합성이 증가함에 따라 성장률이 감소하는 것은 소포체에서 단백질 폴딩에 대한 요구가 증가하여 활성 산소종의 축적으로 인한 것일 수 있다. 각 균주의 라이소자임 분비 능력은 라이소자임에 민감한 그람 양성 균주인 마이크로코커스 라이소데이크티쿠스(*Micrococcus lysodeikticus*)의 용해를 통해 평가되었다(도 1C 및 D). 이중-커피 균주의 라이소자임 분비는 단일-커피 균주의 라이소자임 분비보다 상당히 높았으며 삼중-커피 균주의 경우와 비슷하였다. 따라서 라이소자임 분비가 가장 높고 유전적 변형이 최소화된 이중-커피 균주를 마우스 실험에 사용하였다.



- [0080] <실시예 2> 인산염 완충 식염수(PBS), 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)(SB) 및 라이소자임 분비 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*)(SBLys)의 마우스 투여
- [0081] 1주일 동안 실험 환경에 적응시킨 후, 6주령 마우스에게 14일 동안 매일 경구 위관영양을 투여하고 15일째에 희생시켰다(도 2A). 처리에는 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*) 야생형(SB), 사카로마이세스 보울라디아이(*Saccharomyces boulardii*) 분비 인간 라이소자임(SBLys) 또는 비히클 대조군(인산염 완충 식염수[PBS])이 포함되었다. 모든 경우에, 100 mL를 매일 PBS 또는  $3 \times 10^8$  CFU의 신선한 효모 세포를 함유하는 PBS로 위관영양을 공급하였다. 실험 기간 동안 마우스의 체중은 그룹 간 유의한 차이가 없었다(도 2B). SB에서는 2일째, SBLys에서는 6일째에 대략 6 log 효모 세포/g 분변이 관찰되었다(도 2C). 15일째에 희생된 생쥐의 맹장 및 대장 샘플 내 라이소자임의 양을 인간 라이소자임 ELISA 키트를 사용하여 정량하였으나, 인간 라이소자임은 검출되지 않았다(데이터는 표시되지 않음). 이러한 결과는 경구 위관영양이 완료된 지 1일 후에 모든 잔여 이중단백질이 장에서 배설되었음을 나타낸다.
- [0082] 장에서 SBLys에 의해 분비되는 라이소자임을 정량화하기 위해 추가 마우스를 구입하고 SB 또는 SBLys의 매일 경구 위관영양을 5일 동안 수행하였다(그룹당  $n = 3$ ). 마지막 경구 위관영양 2시간 후, 마우스를 희생시키고 십이지장, 맹장 및 대장 내용물을 수집하여 인간 라이소자임 ELISA 키트를 사용하여 샘플 내 라이소자임 양을 정량화하였다(도 2D). 그 결과, SBLys에서 1.1 mg 라이소자임/g 맹장 함량과 0.2 mg 라이소자임/g 대장 함량이 정량화되었다. SBLys의 효모 CFU는 맹장에서 유사하였고 대장에서 SB 보다 상당히 더 높았다.
- [0084] <실시예 3> 문(Phylum) 수준의 그룹 간 마이크로바이옴의 전반적인 변화
- [0085] SB 및 SBLys 투여 후 장내 마이크로바이옴의 변화를 이해하기 위해 1일, 8일 및 14일에 분변 샘플을 사용하여 PacBio를 사용한 16S 장거리서열분석을 수행하였다. 총 1,331개의 앰플리콘 서열 변이체(ASV)가 확인되었다(미도시됨). 각 ASV는 서로 다른 미생물을 나타낼 수 있다. 각 처리에 따른 장내 미생물의 변화를 조사하기 위해 모든 그룹의 알파 다양성, 문(phylum) 구성, 피르미쿠테스(*Firmicutes*)/박테로이도타(*Bacteroidota*) 비율을 비교하였다(도 3). PBS 그룹의 알파 다양성은 1일차  $2.04 \pm 0.23$ 에서 14일차  $2.41 \pm 0.30$ 으로 증가하였다(도 3A). SB 그룹의 알파 다양성은 1일차  $2.12 \pm 0.30$ 에서 14일차  $2.68 \pm 0.30$ 으로 증가하였다(도 3A). SBLys 그룹의 알파 다양성은 1일차  $1.49 \pm 0.29$ 에서 14일차  $2.08 \pm 0.32$ 로 증가하였다(도 3A). 모든 그룹의 알파 다양성은 시간이 지남에 따라 크게 증가했으며, 이는 쥐의 장내 마이크로바이옴의 다양성이 섭식 실험 기간에 따라 증가했음을 시사한다. 이전 연구에서는 쥐의 나이가 들수록 알파 다양성이 증가한다고 보고하였다. 따라서 실험이 계속되고 마우스가 노화됨에 따라 알파 다양성이 증가하면 결과에 영향을 줄 수 있다. 시간에 따른 문(phylum) 구성의 변화를 각 처리에 대해 조사하였다(도 3B). 그 결과, 마우스 마이크로바이옴은 대부분 베루코마이크로비오타(*Verrucomicrobiota*), 박테로이도타(*Bacteroidota*) 및 피르미쿠테스(*Firmicutes*)로 구성되어 있었다. 베루코마이크로비오타(*Verrucomicrobiota*)는 모든 그룹에서 시간이 지남에 따라 감소했지만 피르미쿠테스(*Firmicutes*)와 박테로이도타(*Bacteroidota*)는 처리에 따라 다르게 변화하였다. PBS 그룹에서 피르미쿠테스(*Firmicutes*)와 박테로이도타(*Bacteroidota*)는 시간에 따라 균형있게 증가하였으며, 1일과 14일의 F/B 비율은 각각  $0.60 \pm 0.19$  및  $0.91 \pm 0.28$ 이었다(도 3C). 대조적으로, SB 그룹에서는 시간이 지남에 따라 피르미쿠테스(*Firmicutes*)와 박테로이도타(*Bacteroidota*)의 비율이 크게 증가하였다(도 3B). SB 투여 후 F/B 비율은 1일차에  $0.91 \pm 0.28$ 이었고, 14일차에  $3.22 \pm 1.70$ 으로 유의하게 증가하였다(도 3C). SBLys 그룹에서 F/B 비율은 1일차  $0.74 \pm 0.35$ 에서 14일차  $1.30 \pm 0.55$ 로 크게 증가하였다(도 3C). 이러한 결과는 SB 또는 SBLys의 경구 투여가 피르미쿠테스(*Firmicutes*)의 비율을 증가시켜 마우스 마이크로바이옴의 변화를 유도하였으며, SBLys보다 SB 투여 후 피르미쿠테스(*Firmicutes*)가 더 많이 증가했음을 시사한다.
- [0087] <실시예 4> SB 투여에 의한 장내 마이크로바이옴의 변화
- [0088] SB 투여 후 장내 마이크로바이옴의 변화를 조사하기 위해 PBS 및 SB 투여 후 분변 마이크로바이옴을 주 좌표 분석(PCoA) 및 계층적 군집 분석(HCA)을 사용하여 시간 경과에 따라 비교하였다. 1,331개의 ASV를 사용한 PCoA 모델은 PBS와 SB 그룹이 PC1을 기반으로 완전히 구별된다는 것을 보여주었다(도 4A). PBS 그룹의 PC1 값은 1일차  $0.19 \pm 0.11$ 에서 14일차  $0.04 \pm 0.09$ 로 감소하였다. SB의 PC1 값은 1일차의  $-0.04 \pm 0.11$ 에서 14일차의  $-0.30 \pm 0.07$ 로 감소하였다. 이러한 변화를 보다 자세히 조사하기 위해 HCA를 수행하였다(도 4B). 분변 샘플은 두 그룹으로 나뉘었고 ASV는 두 개의 ASV 클러스터로 나뉘었다. 클러스터 1은 대부분 PBS 그룹으로 구성되었고, 클러스

터 2는 대부분 SB 그룹으로 구성되었다(도 4B). ASV 클러스터 1은 처음에는 풍부하지 않았지만 시간이 지남에 따라 PBS 그룹에서 증가하는 ASV 또는 각 그룹에서 시간이 지나도 변하지 않는 ASV로 구성되었다. ASV 클러스터 2는 시간이 지남에 따라 SB 그룹에서 증가하는 ASV로 구성되었으며 ASV의 수가 클러스터 1의 ASV보다 훨씬 많았다. PCoA 및 HCA 결과는 PBS 및 SB 그룹의 마이크로바이옴 구성이 1일차에는 서로 유사했지만 14일차에는 완전히 다른 것으로 나타났다.

[0089] PBS 및 SB의 14일 샘플로부터의 분변 마이크로바이옴을 비교하여 SB 투여 후 유의하게 변경된 개별 미생물을 밝혀냈다. 두 가지 기준(P, 0.05, 배수 변화, 2.0)에 따라 크게 변경된 미생물을 선택하고 이를 볼케이노 플롯으로 시각화하였다(도 4C). 각 ASV는 과(family)\_속(genus) 종으로 표시되었다(중복되는 이름의 수는 5개).

[0090] 크게 변화된 92개의 종 중(표 S3), SB에서 85개의 ASV가 크게 증가하였다: 라크노스피라세(*Lachnospiraceae*)\_미분류속(36), 라크노스피라세(*Lachnospiraceae*)\_NK4A136 그룹 미분류종(14), 라크노스피라세(*Lachnospiraceae*)\_블라우티아 코코이테스(*Blautia coccoides*)(6), 오실로스피라세(*Oscillospiraceae*)\_미분류속(6), 라크노스피라세(*Lachnospiraceae*)\_라크노스피라세(*Lachnospiraceae*) 박테리움 NK4A136 그룹(3), 오실로스피라세(*Oscillospiraceae*)\_콜리덱스트리박터(*Colidextribacter*) 미분류종(3), 오실로스피라세(*Oscillospiraceae*)\_오실리박터(*Oscillibacter*) 미분류종(3), 라크노스피라세(*Lachnospiraceae*)\_유박테리움 벤트리오숨(*Eubacterium Ventriosum*)(2), 라크노스피라세(*Lachnospiraceae*)\_라크노클로스트리디움(*Lachnoclostridium*) 미분류종(2), 라크노스피라세(*Lachnospiraceae*)\_투제렐라(*Tuzzerella*) 미분류종(2), 락토바실라세(*Lactobacillaceae*)\_락토바실러스 존스니(*Lactobacillus johnsonii*)(2), 오실로스피라세(*Oscillospiraceae*)\_NK4A214 그룹 미분류종(2), UCG-010 미분류속(2), 라크노스피라세(*Lachnospiraceae*)\_라크노스피라세(*Lachnospiraceae*) 박테리움 A2(1) 및 RF39\_미분류과(1).

[0091] 이 중 82개의 ASV는 클로스트리디아(*Clostridia*)였으며 나머지 3개는 바실리(*Bacilli*)였다. 무리바쿨라세(*Muribaculaceae*)\_미분류속(4), 악커만시아세(*Akkermansiaceae*)\_악커만시아 무시니필라(*Akkermansia muciniphila*)(2) 및 클로스트리디아(*Clostridia*)\_vadinBB60 그룹(1)을 포함하여 7개의 ASV가 SB에서 크게 감소하였다. ASV 유형에는 박테로이디아(*Bacteroidia*) 4개, 베루코마이크로비아(*Verrucomicrobiae*) 2개, 클로스트리디아(*Clostridia*) 1개가 포함되었다.

[0093] <실시예 5> 인간 라이소자임 분비 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*) 투여에 따른 장내 마이크로바이옴의 변화

[0094] 사카로마이세스 보울라디아(*Saccharomyces boulardii*)가 분비한 인간 라이소자임이 마이크로바이옴에 추가 변화를 일으켰는지 확인하기 위해 PBS, SB 및 SBLys 그룹의 14일 샘플에서 얻은 분변 마이크로바이옴을 비교하였다. 총 86개의 ASV가 처리에 따라 크게 변경되었다(P<0.05). 크게 변화된 86개의 ASV를 사용하여 HCA를 수행하여 3개의 그룹 클러스터와 3개의 ASV 클러스터를 얻었다(도 5A). 클러스터 1은 SB 그룹으로 구성되었고, 클러스터 2는 PBS 그룹으로 구성되었으며, 클러스터 3은 SBLys 그룹으로 구성되었다. ASV 클러스터 1은 PBS에서 상대적으로 풍부한 ASV로 구성되었고, ASV 클러스터 2는 SBLys에서 상대적으로 풍부한 ASV로 구성되었으며, ASV 클러스터 3은 SB에서 상대적으로 풍부한 ASV로 구성되었다. ASV 클러스터 1은 프로바이오틱 효모(SB 및 SBLys)를 투여하여 감소되는 ASV로 간주될 수 있다. ASV 클러스터 2는 라이소자임 분비에 의해 증가된 ASV로 간주될 수 있다. ASV 클러스터 3은 프로바이오틱 효모 투여로 증가할 수 있지만 라이소자임 민감성으로 인해 대조군과 유사한 풍부도를 유지하는 ASV로 간주될 수 있다. SBLys 클러스터는 PBS 및 SB 그룹과 달랐으며, 이는 분비된 라이소자임이 장내 미생물 구조를 변경했음을 나타낸다.

[0095] 14일차에 SB 및 SBLys 그룹의 분변 마이크로바이옴을 비교하여 라이소자임에 의해 크게 변경된 개별 미생물을 밝혀냈다. 총 42개의 ASV가 크게 변경되었으며(도 5B), 라크노스피라세(*Lachnospiraceae*)\_미분류속(4), 클로스트리디아(*Clostridia*)\_미분류과(3), 악커만시아세(*Akkermansiaceae*)\_악커만시아 무시니필라(*Akkermansia muciniphila*)(1), 라크노스피라세(*Lachnospiraceae*)\_A2\_미분류종(1), 라크노스피라세(*Lachnospiraceae*)\_라크노스피라세(*Lachnospiraceae*) NK4A136 그룹(1), 오실로스피라세(*Oscillospiraceae*)\_콜리덱스트리박터(*Colidextribacter*) 미분류종(1)은 SB에 비해 SBLys가 크게 증가하였다. 총 31개의 ASV는 SB보다 SBLys에서 현저히 낮았다: 라크노스피라세(*Lachnospiraceae*)\_미분류속(19), 라크노스피라세(*Lachnospiraceae*)\_라크노스피라세(*Lachnospiraceae*) NK4A136 그룹(3), 라크노스피라세(*Lachnospiraceae*)\_NK4A136 그룹 미분류종(2), 라크노스피라세(*Lachnospiraceae*)\_블라우티아 코코이테스(*Blautia coccoides*)(2), 락토바실라세(*Lactobacillaceae*)\_락토바실러스 존스니(*Lactobacillus johnsonii*)(2), 오실로스피라세(*Oscillospiraceae*)\_콜



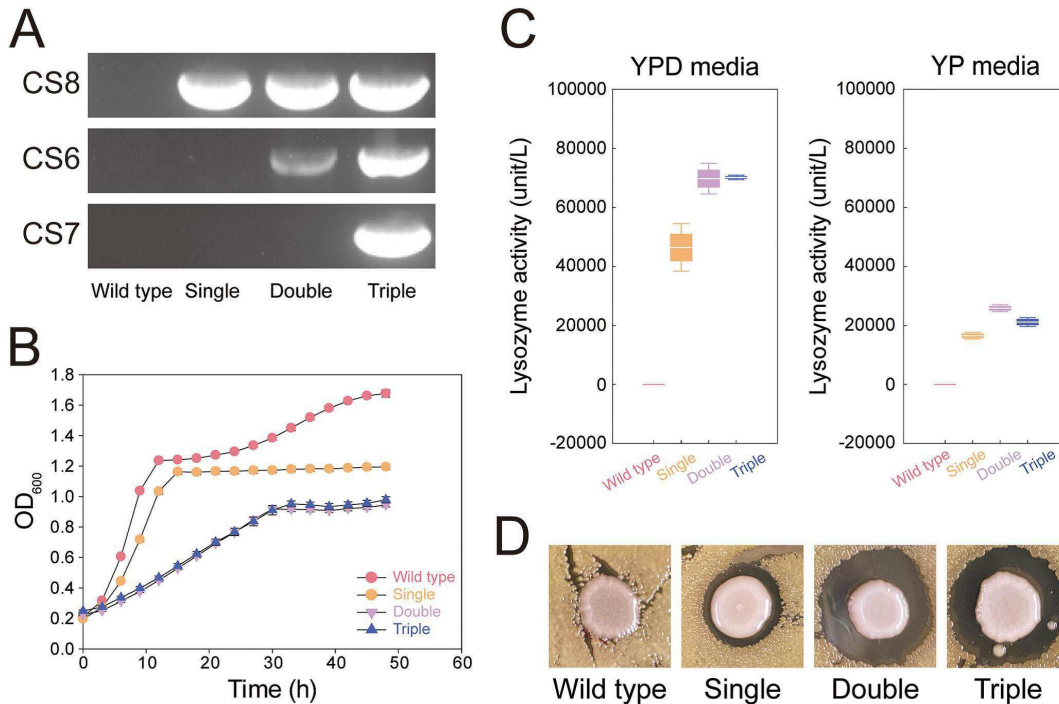
리텍스트리박터(*Colidextribacter*)\_미분류종(2) 및 클로스트리디아세(*Clostridiaceae*)\_클로스트리디움 센수 스트릭토(*Clostridium sensu stricto*) 1(1).

[0097] <실시예 6> SB 및 SBLys 투여에 의한 분변 및 혈청 대사체의 변화

[0098] SB 및 SBLys 투여에 의해 유도된 대사체의 변화를 조사하기 위해 14일째 분변 및 혈청에서 대사체를 추출하였다. 가스 크로마토그래피 질량 분석기(GC-MS)를 사용하여 총 79개의 분변 대사체와 17개의 혈청 대사체를 확인하였다. Kruskal-Wallis 테스트는 각 처리에 의해 크게 변경된 개별 대사체를 확인하기 위해 수행되었다. 갈락토스, 포도당, 과당, 아스코르브산, 5,6-디하이드로우라실, 크산틴, 글루타민, 젠티오비오스, 구아닌, N-아세틸글루코사민, 글루콘산, 푸코스, 3-하이드록시부티르산, 4-하이드록시페닐아세트레이트 및 1,3-디아미노프로판 을 포함한 15개의 분변 대사체가 크게 변경되었다. 15개의 크게 변경된 분변 대사체를 포함하는 HCA는 3개의 그룹 클러스터와 2개의 대사체 클러스터를 보여주었다(도 6A). 대사체 클러스터 1은 SB 그룹에는 풍부하지만 SBLys 그룹에는 덜 풍부한 대사체로 구성되었다. 대사체 클러스터 2는 N-아세틸글루코사민(GlcNAc), 갈락토스, 포도당, 푸코스, 과당 및 젠티비오스와 같은 주로 당류인 SBLys 그룹이 풍부하고 PBS 및 SB 그룹이 적은 대사체로 구성된다. 크게 영향을 받는 생화학적 대사를 확인하기 위해 대사체 농축 분석(MSEA)을 수행하였다. 유당 분해, 아미노당 대사, 갈락토오스 대사, 과당 및 만노스 분해와 같은 당 대사와 퓨린 대사 및 스펅고 지질 대사와 같은 뉴클레오티드 대사가 크게 변경되었다(도 6B). 총 5가지 혈청 대사물질인 요소, 숙신산, 팔미트산, 이소부텐글리콜, 구연산은 그룹에 따라 크게 변화하였다. 5개의 유의하게 변화된 혈청 대사체가 있는 HCA는 2개의 클러스터를 보여주었다. 하나는 프로바이오틱 효모(SB 및 SBLys)로 구성되고 다른 하나는 PBS로 구성된다(도 6C). 모든 대사체는 PBS 그룹에서 풍부했고, SB 및 SBLys 그룹에서는 낮았다. MSEA 결과는 구연산 순환, Warburg 효과 및 미토콘드리아 전자 수송 사슬과 같은 에너지 관련 대사 경로가 크게 영향을 받는 것으로 나타났다(도 6D).

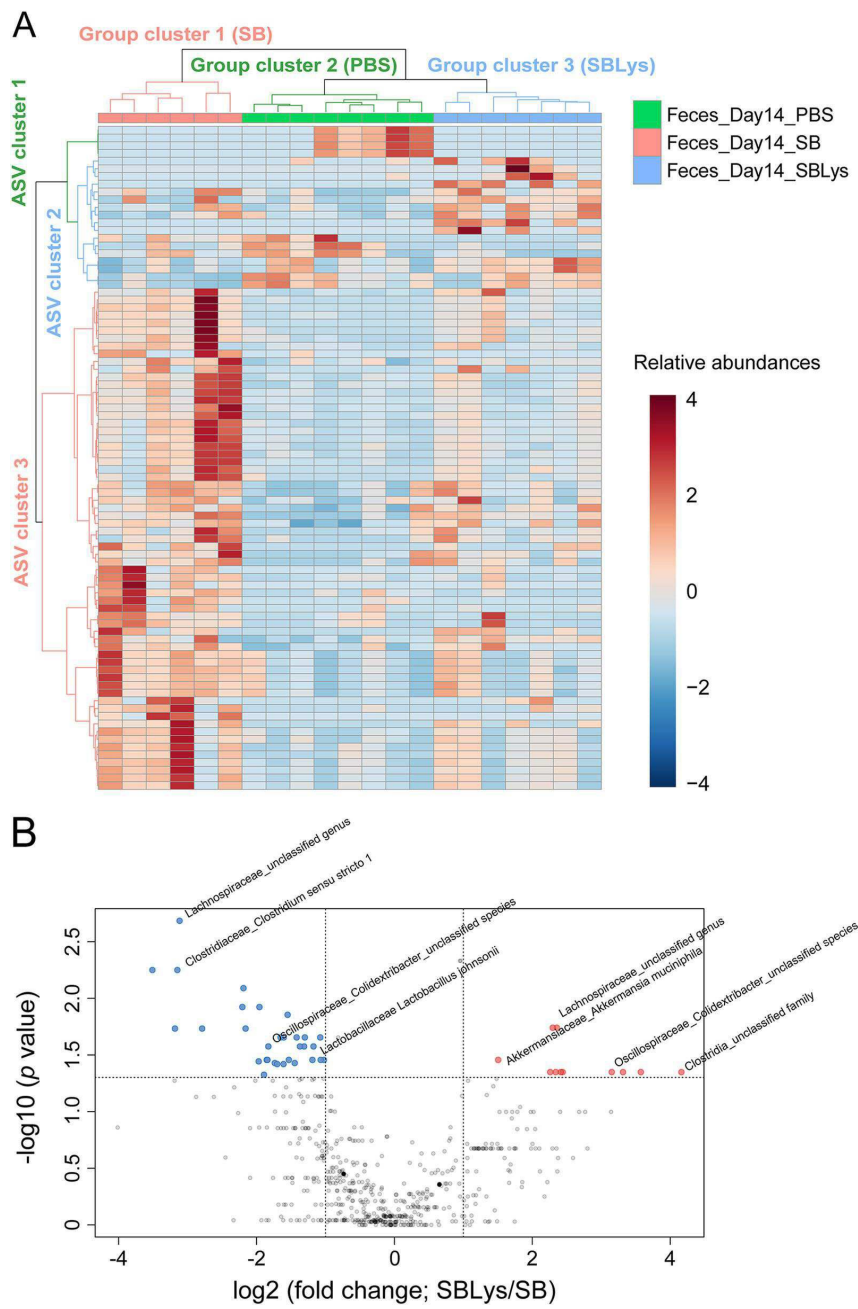
## 도면

### 도면1

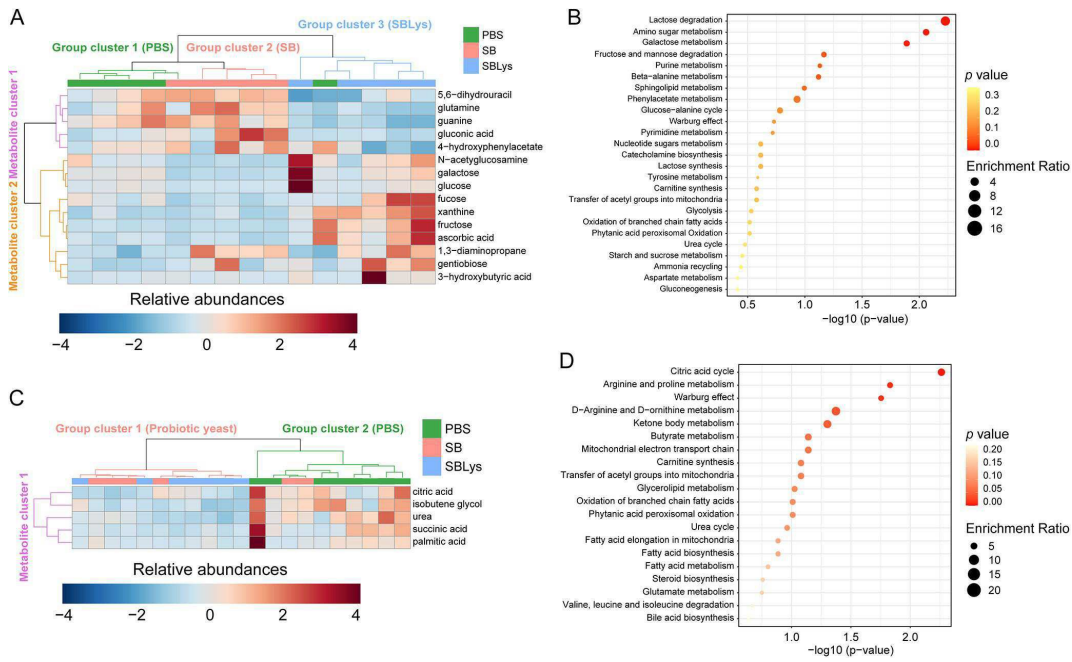




도면5



도면6



## 서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.