



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0013232
(43) 공개일자 2022년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/02 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/0008 (2013.01)
B01D 53/84 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0092545
(22) 출원일자 2020년07월24일
심사청구일자 2020년07월24일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
김용환
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
강성혁
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
김석민
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
리엔목특허법인

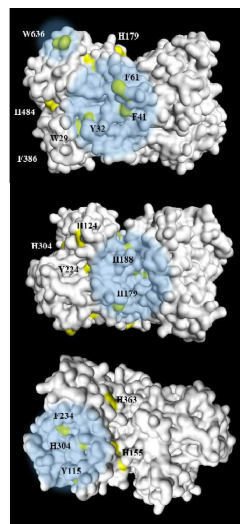
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 전자전달체에 대한 친화도 및 반응 속도가 우수한 일산화탄소 탈수소효소 및 그의 용도

(57) 요약

일 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)에 관한 것으로, 구체적으로, 아미노산 잔기를 돌연변이시켜 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 돌연변이 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 제공한다. 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 상온, 상압에서 독성이 있는 일산화탄소를 신속하게 산화시켜 이산화탄소로 전환시킴으로써 무독화할 수 있다. 나아가, 석유화학, 철강산업 등의 산업체, 담배 연소, 가정용 취사기구, 각종 보일러 연소 시 다량 배출되는 일산화탄소를 담배필터, 공기정화기, 가정용 취사기구 흡입필터, 가스보일러 등을 통해 제거가 가능한 바, 다양한 활용이 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/70 (2013.01)

C12Y 102/07004 (2013.01)

B01D 2257/502 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711103833
과제번호	2015M3D3A1A01064919
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기후변화대응기술개발(R&D)
연구과제명	Non-acetogen 기반 CO 가스 이용 바이오폴리머 생산용 바이오촉매 및 원천기술 개발
기 여 율	80/100
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711119400
과제번호	2020R1A5A1019631
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	미세플라스틱 대응 화공/바이오 융합 공정 연구센터
기 여 율	20/100
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2020.07.01 ~ 2021.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

전자전달체에 대한 친화도 또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase).

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 전자전달체는 바이올로젠(viologen) 기를 가지는 전자전달체인, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase).

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 32번째 아미노산, 41번째 아미노산, 57번째 아미노산, 59번째 아미노산, 65번째 아미노산, 98번째 아미노산, 179번째 아미노산 및 188번째 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산이 변형된 것인, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase).

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 변형은 결실, 추가 및 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인 것인, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase).

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 32번째 아미노산은 티로신(Tyrosine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 41번째 아미노산은 페닐알라닌(Phenyl alanine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 57번째 아미노산은 아르기닌(Arginine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 59번째 아미노산은 아스파라긴(Asparagine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 65번째 아미노산은 프롤린(Proline)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 98번째 아미노산은 리신(Lysine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 179번째 아미노산은 히스티딘(Histidine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 188번째 아미노산은 히스티딘(Histidine)인, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase).

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 변형은 치환이며,

치환된 아미노산은 알라닌(Alanine), 글리신(Glycine), 류신(Leucine), 글루탐산(Glutamic acid), 세린(Serine), 페닐알라닌(Phenyl alanine), 글루타민(Glutamine), 리신(Lysine) 및 아스파르트산(Aspartic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산인, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase).

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 서열번호 14 내지 35의 염기 서열로 이루

어진 군에서 선택되는 하나의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질인, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase).

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 전자전달체에 대한 친화도는 야생형(Wild type)에 비해 1 내지 5배 증가된 것인, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase).

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 반응 속도는 야생형(Wild type)에 비해 1 내지 5배 증가된 것인, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase).

청구항 10

전자전달체에 대한 친화도 또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 11

전자전달체에 대한 친화도 또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현하는 벡터.

청구항 12

전자전달체에 대한 친화도 또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현하는 미생물.

청구항 13

전자전달체에 대한 친화도 또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 제조 방법.

청구항 14

일산화탄소에 전자전달체에 대한 친화도 또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 접촉시키는 단계를 포함하는 일산화탄소의 제거 방법.

청구항 15

일산화탄소에 전자전달체에 대한 친화도 또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 접촉시키는 단계를 포함하는 이산화탄소의 제조 방법.

청구항 16

전자전달체에 대한 친화도 또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 포함하는 일산화탄소 제거 장치.

청구항 17

전자전달체에 대한 친화도 또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 포함하는 필터.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 우수한 일산화탄소 탈수소효소 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 가정이나 산업현장에서 탄소의 불완전한 연소에 의하여 상당히 많은 양의 일산화탄소가 발생하고 있다. 일산화탄소는 산소에 비하여 매우 높은 친화력을 가지고 혈중 적혈구 세포의 헤모글로빈 단백질에 결합하는 특성을 보인다. 이로 인하여 일산화탄소가 일정 농도 이상이 포함된 공기를 흡입할 경우 산소 부족현상으로 인하여 심장 박동수 증가로 인한 혈압 증가로 인한 혈관 손상 및 최악의 경우 의식불명, 사망에까지 이를 수 있다. 따라서 공기 중에 포함된 독성의 일산화탄소를 상온상압하에서 간단히 산화하여 무해한 이산화탄소로 전환할 필요가 있다.

[0004] 특히 담배의 경우 흡연자가 흡입하는 기체 중에 이산화탄소가 9 ~ 14% (45 ~ 65 mg / 담배 1개비)를 차지한다면 일산화탄소는 2.8 ~ 4.6% (14 ~ 23 mg / 담배 1개비)를 차지할 정도로 매우 높은 비율로 일산화탄소가 발생하고 흡입되어 흡연자 및 간접흡연자들의 건강을 치명적으로 위협하는 요인이 되고 있다. 담배필터에는 활성탄 등의 흡착제가 있으나 일산화탄소를 흡착할 정도의 특이성과 성능을 가지지 못하는 단점이 있어 일산화탄소를 효과적으로 제거하지 못하는 형편이다.

[0005] 한편, 일산화탄소 탈수소효소(Carbon monoxide dehydrogenase, CO dehydrogenase: CODH)는 미생물 내에서 대사 효소 중 하나로서, 독성이 높은 일산화탄소 가스를 상온 및 상압에서 산화시켜 이산화탄소로 전환시킬 수 있는 효소이다(하기 반응식 1 참조). 이 때, 산소를 전자수용체로 사용하는 것이 아니고 물 분자를 전자수용체로 사용하는 것이 독특한 특성이며, 일산화탄소 산화에 있어서 산소 분자가 필요한 것이 아니고 물 분자와 동시에 생성된 전자를 수용할 수 있는 전자 수용체가 필요하다. 일반적으로 사용되는 전자수용체는 FMN, FAD 등과 같이 플라빈기를 가지는 자연계 유래 전자전달체와 바이올로젠(viologen)기를 가지는 인공 전자전달체로 대별될 수 있다.

[0006] [반응식 1]

[0007] $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$

[0008] 현재까지 알려진 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 플라빈기를 가지는 전자전달체를 전자수용체로 이용할 수 있으나, FAD, FMN과 같은 전자전달체는 구조가 복잡하고, 수계 환경하에서 안정성이 낮아서 매우 단수명이며, 가격이 매우 고가인 단점이 존재하였다. 바이올로젠(viologen)기를 가지는 인공전자전달체의 경우 구조가 간단하고, 수계 환경하에서 안정성이 높아 수명이 매우 길며, 가격 역시 상당히 저렴함에도 불구하고, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 이러한 인공전자전달체를 인식하는데 어려움이 있기에 둘 사이에 친화도는 플라빈계 전자전달체에 비하여 상당히 낮아 전체적인 반응속도가 저하되는 문제점이 존재하였다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 바이올로젠(viologen)기를 가지는 인공전자전달체에 대한 친화도가 우수한 돌연변이 일산화탄소 탈수소효소를 개발하기에 이르렀다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Bond, S.R., Naus, C.C. 2012. RF-Cloning.org: an online tool for the design of restriction-free cloning projects. Nucleic Acids Res. 40(W1), W209-W213.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 일 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 제공하는 것이다.
- [0013] 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [0014] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현하는 벡터를 제공하는 것이다.
- [0015] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현하는 미생물을 제공하는 것이다.
- [0016] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0017] 또 다른 양상은 일산화탄소에 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 접촉시키는 단계를 포함하는 일산화탄소의 제거 방법을 제공하는 것이다.
- [0018] 또 다른 양상은 일산화탄소에 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 접촉시키는 단계를 포함하는 이산화탄소의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0019] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 포함하는 일산화탄소 제거 장치를 제공하는 것이다.
- [0020] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 포함하는 필터를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0022] 일 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 제공한다.
- [0023] 상기 전자전달체에 대한 친화도는 전자전달체와 결합력이 우수한 것을 의미하며, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 미하엘리스 상수(K_M)를 측정함으로써 확인할 수 있다.
- [0024] 일 실시예에 있어서, 상기 전자전달체는 천연 전자전달체일 수 있으며, 인공 전자전달체일 수 있다. 또한, 상기 전자전달체는 바이올로젠(viologen)기를 가지는 전자전달체일 수 있고, 예를 들어, 알킬 바이올로젠(alkyl viologen) 또는 벤질 바이올로젠(benzyl viologen)일 수 있고, 구체적으로, 메틸 바이올로젠(methyl viologen), 에틸 바이올로젠(ethyl viologen), 프로필 바이올로젠(propyl viologen) 등을 포함하는 알킬 바이올로젠(alkyl viologen)일 수 있으며, 보다 구체적으로는 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)일 수 있다.
- [0025] 일 실시예에 있어서, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 야생형(Wild type)에 비해 전자전달체에 대한 친화도가 1 내지 5배, 1 내지 4배, 1 내지 3.5배, 2 내지 5배, 2 내지 4배, 2 내지 3.5배, 2.5 내지 5배, 2.5 내지 4배 또는 2.5 내지 3.5배 증가된 것일 수 있다.

- [0026] 상기 효소의 반응 속도는 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)가 하기 반응식 1의 반응을 촉매하는 반응이 일어나는 속도를 의미하는 것으로서, 반응속도상수를 측정함으로써 확인할 수 있다:
- [0027] [반응식 1]
- [0028] $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$.
- [0029] 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 활성 및 반응 속도는 일산화탄소 및 물을 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)에 접촉시켜 발생하는 이산화탄소, 수소이온 또는 전자를 측정함으로써 확인할 수 있다.
- [0030] 일 실시예에 있어서, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 야생형(Wild type)에 비해 반응 속도가 1 내지 5배, 1 내지 4배, 1 내지 3.5배, 2 내지 5배, 2 내지 4배, 2 내지 3.5배, 2.5 내지 5배, 2.5 내지 4배 또는 2.5 내지 3.5배 증가된 것일 수 있다.
- [0031] 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 천연으로부터 유래될 수도 있고, 당해 분야에서 널리 공지된 다양한 단백질 합성 방법으로 획득할 수 있다. 일례로서, 폴리뉴클레오타이드 재조합과 단백질 발현 시스템을 이용하여 제조하거나 단백질 합성과 같은 화학적 합성을 통하여 시험관 내에서 합성하는 방법 및 무세포 단백질 합성법 등으로 제조될 수 있다. 또한, 일례로서, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 펩티드, 식물 유래 조직이나 세포의 추출물, 미생물(예를 들어 세균류 또는 진균류, 그리고 특히 효모)의 배양으로 얻어진 생산물일 수 있다.
- [0032] 용어 "단백질(Protein)"은 아마이드 결합 (또는 펩티드 결합)으로 연결된 2개 이상의 아미노산으로 이루어진 폴리머를 의미한다.
- [0033] 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 아미노산 서열과 각각 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 92% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 단백질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 동질효소일 수 있다. 구체적으로 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 무렐라 썬모아세티카(*Moorella thermoacetica*), 로도스 피릴룸 루브룸(*Rhodospirillum rubrum*), 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*), 메타노코쿠스 바니엘리(*Methanococcus vannielii*), 메타노사르시나 바커리(*Methanosarcina barkeri*), 메타노씨모박터 썬마우토티로피커스(*Methanothermobacter thermautotrophicus*), 클로스티리움 파스튜리아눔(*Clostridium pasteurianum*), 올리고트로파 카르복시도보란스(*Oligotropha carboxidovorans*), 에르피룸 페르닉스(*Aeropyrum pernix*), 페로글로버스 플라씨더스(*Ferroglobus placidus*), 클로스티리움 아우토에타노게눔(*Clostridium autoethanogenum*), 클로스트리움 라그스달레이(*Clostridium ragsdalei*), 클로스티리움 리웅달리(*Clostridium ljungdahlii*), 클로스티리움 스카톨로게네스(*Clostridium scatologenes*), 클로스티리움 아세토뷰틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*), 클로스티리움 베이예린키(*Clostridium beijerinckii*), 클로스티리움 페르프링겐스(*C. perfringens*), 클로스티리움 썬모셀룸(*C. thermocellum*), 클로스티리움 클루이베리(*C. kluyveri*), 클로스티리움 보툴리눔(*C. botulinum*) 유래 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)일 수 있고, 구체적으로 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)일 수 있고, 보다 구체적으로, 야생형의 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소-2(CO dehydrogenase-2: CODH-2)인 경우 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드가 코딩하는 단백질일 수 있고, 야생형의 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소-4(CO dehydrogenase-4: CODH-4)인 경우, 서열번호 2의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드가 코딩하는 단백질일 수 있다.
- [0034] 또한, 상기 일산화탄소 탈수소효소는 일산화탄소 탈수소효소-1(CO dehydrogenase-1: CODH-1), 일산화탄소 탈수소효소-2(CO dehydrogenase-2: CODH-2), 일산화탄소 탈수소효소-3(CO dehydrogenase-3: CODH-3) 및 일산화탄소 탈수소효소-4(CO dehydrogenase-4: CODH-4)로 이루어진 군에서 선택되는 하나의 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)일 수 있으며, 구체적으로 일산화탄소 탈수소효소-2(CODH-2) 또는 일산화탄소 탈수소효소-4(CODH-4)일 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 1 또는 2의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드가 코딩하는 단백질일 수 있다.
- [0035] 용어 "상동성(Homology)"은 야생형 아미노산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 이러한 상동성의

비교는 당업계에서 널리 알려진 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있으며, 2개 이상의 서열간 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있다.

- [0036] 또한, 보다 나은 화학적 안정성, 강화된 약리 특성(반감기, 흡수성, 역가, 효능 등), 변경된 특이성(예를 들어, 광범위한 생물학적 활성 스펙트럼), 감소된 항원성을 획득하기 위하여, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 N- 또는 C-말단에 보호기가 결합되어 있을 수 있다. 상기 보호기는 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리스틸기, 스테아릴기 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 개질, 특히 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 안정성을 증진시킬 수 있는 성분이라면, 제한없이 포함할 수 있다.
- [0037] 상기 용어 "안정성"은 생체 내 단백질 절단 효소의 공격으로부터 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 보호하는 *in vivo* 안정성뿐만 아니라, 저장 안정성(예컨대, 상온 저장 안정성)도 의미하는 것일 수 있다.
- [0038] 아울러, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기를 위한 특정 목적으로 제조된 아미노산 서열도 추가적으로 포함할 수 있고, 구체적으로 pET-28(서열번호 3) 플라스미드에서 발현되는 His-tag 말단의 단백질과 결합된 형태일 수 있다.
- [0039] 일 실시예에 있어서, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 32번째 아미노산, 41번째 아미노산, 57번째 아미노산, 59번째 아미노산, 65번째 아미노산, 98번째 아미노산, 179번째 아미노산 및 188번째 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산이 변형된 것일 수 있다.
- [0040] 또한, 일 실시예에 있어서, 상기 변형은 결실, 추가 및 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나일 수 있고, 하나의 아미노산이 변형된 것일 수 있고, 두 개 이상의 아미노산이 변형된 것일 수 있다.
- [0041] 일 실시예에 있어서, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 32번째 아미노산은 티로신(Tyrosine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 41번째 아미노산은 페닐알라닌(Phenyl alanine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 57번째 아미노산은 아르기닌(Arginine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 59번째 아미노산은 아스파라긴(Asparagine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 65번째 아미노산은 프롤린(Proline)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 98번째 아미노산은 리신(Lysine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 179번째 아미노산은 히스티딘(Histidine)이고, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 188번째 아미노산은 히스티딘(Histidine)일 수 있다.
- [0042] 또한, 일 실시예에 있어서, 상기 변형이 치환인 경우, 치환된 아미노산은 알라닌(Alanine), 글리신(Glycine), 류신(Leucine), 글루탐산(Glutamic acid), 세린(Serine), 페닐알라닌(Phenyl alanine), 글루타민(Glutamine), 리신(Lysine) 및 아스파르트산(Aspartic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산일 수 있다.
- [0043] 구체적으로, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 32번째 아미노산인 티로신(Tyrosine)은 알라닌(Alanine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 41번째 아미노산인 페닐알라닌(Phenyl alanine)은 알라닌(Alanine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 57번째 아미노산인 아르기닌(Arginine)은 글리신(Glycine), 알라닌(Alanine), 글루탐산(Glutamic acid), 세린(Serine), 페닐알라닌(Phenyl alanine) 또는 글루타민(Glutamine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 59번째 아미노산인 아스파라긴(Asparagine)은 류신(Leucine), 알라닌(Alanine), 페닐알라닌(Phenyl alanine), 리신(Lysine), 아스파르트산(Aspartic acid) 또는 글리신(Glycine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 65번째 아미노산인 프롤린(Proline)은 리신(Lysine) 또는 아스파르트산(Aspartic acid)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 98번째 아미노산인 리신(Lysine)은 알라닌(Alanine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 179번째 아미노산인 히스티딘(Histidine)은 알라닌(Alanine)으로 치환될 수 있고; 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 188번째 아미노산인 히스티딘(Histidine)은 알라닌(Alanine)으로 치환될 수 있으며, 상기 치환은 하나의 아미노산이 치환된 것일 수 있고, 두 개 이상의 아미노산이 치환된 것일 수 있다.
- [0044] 보다 구체적으로, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 서열번호 14 내지 35의 염기 서열로 이루어

진 군에서 선택되는 하나의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질을 수 있다.

- [0046] 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0047] 상기 "전자전달체", "친화도" 또는 "반응 속도" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [0048] 상기 폴리뉴클레오티드는 복수의 뉴클레오티드가 연속적으로 연결된 것을 의미하며, 상기 폴리뉴클레오티드는 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현할 수 있다.
- [0049] 용어 '발현(expression)'은 폴리펩티드(polypeptide)이 구조 유전자로부터 생산되는 과정을 지칭한다. 상기 과정은 유전자(폴리뉴클레오티드)의 mRNA로의 전사, 및 이러한 mRNA의 폴리펩티드(단백질)(들)로의 해독을 포함한다.
- [0050] 용어 '효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드'는 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(polynucleotide), 또는 추가적인 코딩 및/또는 넌-코딩(non-coding) 서열을 더 포함하는 폴리뉴클레오티드를 말한다.
- [0051] 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)가 야생형의 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrnus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소-2(CODH-2)인 경우 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 야생형의 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrnus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소-4(CODH-4)인 경우, 서열번호 2의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [0052] 또한, 구체적으로 상기 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 14 내지 35의 염기 서열로 이루어진 군에서 선택되는 하나의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [0054] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현하는 벡터를 제공한다.
- [0055] 상기 "전자전달체", "친화도", "반응속도" 또는 "발현" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [0056] 용어 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다.
- [0057] 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현하는 벡터는 재조합 벡터일 수 있고, 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈(pET-28 포함) 및 pUC19 등), 파지 또는 바이러스 (예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있고, 구체적으로, pET-28(서열번호 3)일 수 있다.
- [0058] 용어 '재조합 벡터'는 목적하는 클로닝된 유전자(들)를 함유하는 임의의 클로닝 또는 발현 벡터를 포함한다.
- [0059] 용어 '재조합'은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 코딩된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [0060] 상기 재조합 벡터에서 상기 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있다.
- [0061] 용어 "작동 가능하게 연결된(operatively linked)"은 뉴클레오티드 발현 조절 서열(예를 들어, 프로모터 서열)과 다른 뉴클레오티드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미한다. 상기 조절 서열은 "작동 가능하게 연결(operatively linked)"됨으로써 다른 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다.

- [0062] 상기 재조합 박터는, 전형적으로 클로닝을 위한 박터 또는 발현을 위한 박터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 박터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 박터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.
- [0063] 상기 재조합 박터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 박터가 발현 박터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예를 들어, CMV 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 박터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [0064] 일 실시예에 있어서, 상기 재조합 박터에 도입된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 코딩하는 유전자가 야생형의 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrnus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소-2(CODH-2)인 경우, 상기 재조합 박터는 서열번호 4의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 야생형의 카르복시도씨머스 하이드로게노포르만스(*Carboxydotherrnus hydrogenoformans*) 유래 일산화탄소 탈수소효소-4(CODH-4)인 경우, 상기 재조합 박터는 서열번호 5의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [0066] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 발현하는 미생물을 제공한다.
- [0067] 상기 "전자전달체", "친화도", "반응 속도", "일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)" 또는 "발현" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [0068] 상기 미생물은 재조합 미생물일 수 있고, 상기 미생물은 상기 재조합 박터를 적절한 숙주 미생물에 도입시킴으로써 얻어진 것일 수 있다. 상기 미생물은 상기 재조합 박터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 세포로서 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 원핵 세포로는, 예를 들어, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉐린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있으며, 진핵 세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, Sp2/0, CHO(Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN, MDCK 세포주 등이 이용될 수 있고, 구체적으로, *E. coli* BL21일 수 있다.
- [0070] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 제조 방법을 제공한다.
- [0071] 상기 "전자전달체", "친화도", "반응 속도", "일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)", "발현" 또는 "미생물" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [0072] 상기 배양은 공지된 통상의 배양 방법일 수 있고, 구체적으로 상기 미생물에 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 표지하는 단백질을 발현하는 플라스미드를 상기 미생물에 도입하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0073] 일 실시예에 있어서, 상기 제조 방법은 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 발현을 촉진할 수 있는 물질을 처리하는 단계 및 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0074] 상기 제조 방법에 의해 제조된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 전자전달체에 대한 친화도와 반응 속도가 우수하여 신속하게 일산화탄소를 제거할 수 있다.

- [0076] 또 다른 양상은 일산화탄소에 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 접촉시키는 단계를 포함하는 일산화탄소의 제거 방법을 제공한다.
- [0077] 상기 "전자전달체", "친화도", "반응 속도", "일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)" 또는 "발현" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [0078] 상기 접촉을 통해 일산화탄소는 물과 반응하여 이산화탄소, 수소이온, 전자로 변형되며, 전자전달체에 대한 친화도와 반응 속도가 우수하여 신속하게 일산화탄소가 제거될 수 있다.
- [0080] 또 다른 양상은 일산화탄소에 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 접촉시키는 단계를 포함하는 이산화탄소의 제조 방법을 제공한다.
- [0081] 상기 "전자전달체", "친화도", "반응 속도", "일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)" 또는 "발현" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [0082] 상기 접촉을 통해 일산화탄소는 물과 반응하여 이산화탄소, 수소이온, 전자로 변형되며, 전자전달체에 대한 친화도와 반응 속도가 우수하여 신속하게 이산화탄소가 제조될 수 있다.
- [0084] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 포함하는 일산화탄소 제거 장치를 제공한다.
- [0085] 상기 "전자전달체", "친화도", "반응 속도", "일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)" 또는 "발현" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [0086] 상기 장치에 포함된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 일산화탄소를 물과 반응시켜 이산화탄소, 수소이온, 전자로 변형시키며, 전자전달체에 대한 친화도와 반응 속도가 우수하여 신속하게 일산화탄소가 제거될 수 있다.
- [0087] 상기 장치는 유해 가스 처리 기술이 필요한 산업 현장, 공기 내 유해 물질 살균/제거 정화기술 및 시스템, 차량, 열차 등 이동수단 내 실내 공기질 관리를 위한 처리시설 및 관련기술, 환기효율 및 경제적 환기를 위한 기술 및 장치, 공기청정기, 에어컨, 환풍기 등과 같은 실내공기 정화장치 등에 포함될 수 있다.
- [0089] 또 다른 양상은 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 포함하는 필터를 제공한다.
- [0090] 상기 "전자전달체", "친화도", "반응 속도", "일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)" 또는 "발현" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [0091] 상기 필터에 포함된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 일산화탄소를 물과 반응시켜 이산화탄소, 수소이온, 전자로 변형시키며, 전자전달체에 대한 친화도와 반응 속도가 우수하여 신속하게 일산화탄소가 제거될 수 있다.
- [0092] 상기 필터는 담배 필터, 공기청정기 필터 등 일산화탄소가 발생하는 장소에서 다양한 필터에 적용될 수 있으며, 나아가 유해 가스 처리 기술이 필요한 산업 현장, 공기 내 유해 물질 살균/제거 정화기술 및 시스템, 차량, 열차 등 이동수단 내 실내 공기질 관리를 위한 처리시설 및 관련기술, 환기효율 및 경제적 환기를 위한 기술 및 장치, 공기청정기, 에어컨, 환풍기 등과 같은 실내공기 정화장치 등에 포함될 수 있다.

발명의 효과

- [0094] 일 양상에 따른 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 전자전달체에 대한 친화도 및/또는 반응 속도가 증가된 것으로서, 상기 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 상온, 상압에서 독성이 있는 일산화탄소를 신속하게 산화시켜 이산화탄소로 전환시킴으로써 무독화할 수 있다. 나아가, 석유화학, 철강산업 등의 산업체, 담

배 연소, 가정용 취사기구, 각종 보일러 연소 시 다량 배출되는 일산화탄소를 담배필터, 공기정화기, 가정용 취사기구 흡입필터, 가스보일러 등을 통해 제거가 가능한 바, 다양한 활용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

도 1은 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase) 효소 단백질 표면에 존재하는 방향족계 아미노산 분포를 나타낸 도로서, 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase) 효소 단백질 표면 잔기 중 전자전달체와 반응 후보 부위 결정하기 위해 사용된 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예

1. 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 돌연변이 부위의 결정

현재까지 알려진 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 구조 정보를 바탕으로 표면에 존재하면서 바이올로젠(viologen)계 전자전달체에 전자를 전달할 가능성이 높은 다양한 방향족계 아미노산 잔기를 결정하였다(도 1).

이 중에서 가장 활성이 높은 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)는 *Carboxydotherrnus hydrogenoformans* 유래 ChCODH-II로서 Y32, F41, R57, K98, H179, H188를 돌연변이 부위로서 결정하였다. 이 잔기를 알라닌으로 치환된 ChCODH-II를 제작한 후 인공전자전달체 중의 하나인 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)을 이용하여 일산화탄소(CO) 산화 실험의 진행을 수행하여 어느 부분이 전자를 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)에 전자를 전달하는 표면 핵심 잔기인지를 확인하였으며, 이 후 해당 주변에 해당되는 잔기를 다른 잔기로 치환함으로써 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)과의 친화도가 높은 효소를 결정하였다.

2. 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 돌연변이체의 제작

일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase: CODH)의 기질 중 하나인 에틸 바이올로젠(ethyl viologen: EV)의 결합 부위를 찾고자 하였다.

(1) 야생형 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)

일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 유전자 변이 주형(template)으로 이용하기 위해 *C. hydrogenoformans*(GenBank no. NC_007503) 유래 ChCODH-2 및 ChCODH-4 단백질을 코딩하는 유전자(서열번호 1 및 2)는 GenScript사(Piscataway, NJ, USA)에 의해 인위적으로 합성하였다.

상기 합성된 *C. hydrogenoformans* 유래 ChCODH-2 혹은 ChCODH-4 유전자는 *NdeI/BamHI* 혹은 *NdeI/XhoI*의 제한효소들 (New England BioLabs Inc., US)로 37℃, 20분간 절단한 후, SolGent™ T4 DNA Ligase를 이용하여 발현용 벡터 pET-28(Novagen, USA, 서열번호 3)에 클로닝하였다. 상기 CO 탈수소효소 유전자를 함유하는 벡터(서열번호 4 및 5)를 대장균(*Escherichia coli*) BL21에 열충격 (heat chock, 42℃, 1분)도입하여 야생형 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 함유하는 재조합 미생물을 제조하였다.

(2) 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase) 기질 결합 부위 탐색 및 돌연변이 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 제작

실시예 2.-(1)에서 합성된 야생형 ChCODH-2를 주형으로 하여 효소 표면의 전자 전달이 가능한 다양한 아미노산을 전자 전달이 불가능한 알라닌 아미노산으로 부위-지정 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis)하여 활성

을 나타내지 않는 변이주를 통해 해당 부위가 효소의 기작에 핵심으로 작용하는 부위임을 확인하였다.

[0113] 상기 변이형 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase) 합성에서 사용된 프라이머의 정보는 표 1과 같다.

표 1

치환 아미노산	프라이머	삽입벡터	서열번호
F41A	F-5' cagtgcggtgcggcgcaaacgggtctgtgct	pET28a	6
	R-5' gggttcgcccgcaccgcactgcggcttcacgcg		7
R57G	F-5' ggtccgtgcggtattaacccgtttggcgat		8
	R-5' cgggttaataaccgcacggaccttgaggca		9
N59L	F-5' tgccgtattcttccgtttggcgatgagccg		10
	R-5' gccaaacggaagaataccgcacggaccttg		11
R57G/N59L	F-5' tgcggtattcttccgtttggcgatgagccg		12
	R-5' gccaaacggaagaataccgcacggaccttg		13

[0117] 3. 기질 결합력이 향상된 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 발현과 정제

[0118] 상기 재조합 미생물 유래 전자전달체에 대한 친화도가 우수한 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 얻기 위해서 pET-28(서열번호 3) 발현벡터를 이용하여 His-tag말단의 변이형 CO 탈수소효소를 함유하는 발현벡터로 합성하였다. 합성된 변이형 CO 탈수소효소 발현벡터는 pRKISC(*J. Biochem.* 126:917, 1999) 플라스미드가 포함된 대장균 BL21으로 도입하여 최종 재조합 미생물을 완성하였고, 이를 각각 배양하여 His-tag말단의 단백질 형태로 발현을 유도하여 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 정제하였다.

[0119] 상기 배양은 50 µg/mL 카나마이신, 10 µg/mL 테트라사이클린, 0.02 mM 염화니켈 (NiCl₂), 0.1 mM 황산제일철 (FeSO₄), 2 mM 엘-시스테인(L-cysteine)이 포함되어 있는 TB medium (400 mL, 2 L 플라스크)에서, 37℃, 200 rpm의 조건으로 재조합 대장균을 호기적으로 배양하였다.

[0120] 이 후, 효소의 발현 유도(induction)를 위해서 OD₆₀₀(optical density) 값이 약 0.4 ~ 0.6이 된 후에 세럼병 (serum bottle)으로 옮긴 후 질소 치환(N₂-fluxing)과정을 진행하였으며, 해당 과정 중 0.2 mM 농도의 isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside(IPTG)와 0.5 mM 염화니켈(NiCl₂), 1 mM 황산제일철(FeSO₄), 50 mM 질산 칼륨(KNO₃)를 각각 추가하였다.

[0121] 이 후, 온도를 30℃로 낮추어 상기 조건에서 24시간 배양 후, 3,700 rpm에서 20분 간 4℃ 환경에서의 원심 분리를 통해 재조합 대장균을 수득하였으며, 혐기챔버(anaerobic chamber)내에서 Ni-NTA 레진을 이용하여 효소를 정제하였다.

[0123] 4. 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 활성 측정

[0124] 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 일산화탄소(CO) 산화 반응의 활성은 일산화탄소가 포화된 30℃ 반응 완충액 내에서 분광광도법(spectrophotometer, 578 nm)으로 효소에 의한 에틸 바이올로젠(ethyl viologen: EV)의 산화-환원반응으로 측정되었다.

[0125] 상기 반응은 혐기챔버 내에서 진행하였으며 큐벳을 이용하였고, 이 때 반응액(1 mL)은 8 mM 산화 에틸바이올로젠 및 일산화탄소 포화된 50 mM HEPES/NaOH 버퍼(pH 8)를 이용하였으며, 해당 반응은 효소 주입으로 시작되어 2분 간 측정되었다. 여기서 CO 탈수소효소 활성의 1 단위(unit)는 온도 30℃, pH 8에서 산화된 에틸바이올로젠 1 mmol을 1분 동안 환원시키는데 필요한 효소의 양으로 정의한다.

[0127] 5. 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 미하엘리스 상수 (K_M) 측정

[0128] 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)에 대한 미하엘리스 상수 (K_M)는 0.125 - 8 mM의 농도를 달리하는 에틸 바이올로젠(ethyl viologen) 환경에서 활성 측정된 자료를 한스-울프 방법 (Hanes-Woolf plot)으로 분석하여 측정하였다. 각 활성 측정은 에틸 바이올로젠(ethyl viologen) 농도를 제외하면 실시예 4와 동일한 방법으로 진행되었다.

[0130] 6. 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 표면에서 인공전자전달체에 전자를 전달하는 부위 결정

[0131] *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* 유래 ChCODH-II의 야생종과 돌연변이체의 활성을 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)을 전자전달체로 이용할 수 있는 활용할 수 있는 능력을 측정하였고, 그 결과는 하기 표 2와 같았다.

표 2

CODH 종류	서열번호	활성 (U/mg)
야생종 ChCODH-II	1	1,000
ChCODH-II R57A	14	1,000
ChCODH-II K98A	15	1,000
ChCODH-II H188A	16	1,000
ChCODH-II Y32A	17	1,000
ChCODH-II H179A	18	1,000
ChCODH-II F41A	19	0

[0135] 실험 결과, 상기 표 2에서 볼 수 있듯이, ChCODH-II F41A 돌연변이체의 경우 활성이 전혀 없는 것을 알 수 있었다. 이로 미루어 보아, 인공전자전달체인 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)에 전자가 전달되는 부위는 표면에 존재하는 F41을 통해서 이루어지던 것이 알라닌으로 치환할 경우 전자가 전달되지 못하여 활성이 사라진 것으로 판단할 수 있었다. 따라서 향후 F41 주변 잔기가 변화된 돌연변이체를 제작하여 결과적으로 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)을 효과적으로 이용할 수 있는 ChCODH-II 돌연변이체를 개발할 수 있을 것으로 생각되었다.

[0137] 7. 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 한 부위 돌연변이체(double mutant)의 인공전자전달체에 대한 친화도 및 반응속도 측정

[0138] *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* 유래 ChCODH-II의 야생종과 돌연변이체의 인공전자전달체 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)에 대한 친화도 및 반응속도를 측정하였다. K_m 값은 친화도의 역수이다.

표 3

CODH 종류	서열번호	K_m (mM)	효소 반응속도 상수 kcat (s^{-1})
야생종 ChCODH-II	1	2.3	2,200
ChCODH-II R57E	20	0.7	1,600
ChCODH-II R57S	21	1.1	4,200
ChCODH-II R57F	22	1.0	1,900
ChCODH-II R57G	23	0.8	100
ChCODH-II R57Q	24	1.1	4,100
ChCODH-II R57A	14	1.2	3,900
ChCODH-II N59L	25	2.9	4,000
ChCODH-II N59A	26	1.9	7,000
ChCODH-II N59F	27	3.4	2,000
ChCODH-II N59K	28	7.0	3,300
ChCODH-II N59D	29	1.6	6,000
ChCODH-II N59G	30	1.6	6,000

ChCODH-II P65K	31	6.0	3,700
ChCODH-II P65D	32	3.5	1,700

[0142] 실험 결과, 상기 표 3에서 볼 수 있듯이, R57E의 경우 기존 야생형에 비하여 K_m 이 2.3 mM에서 0.7 mM으로 1/3 이하로 감소한 것을 볼 수 있었다. 이는 다시 말하면 친화도가 3배 이상 증가하는 것을 의미한다. 다만 반응속도상수는 약간 감소하거나 큰 차이가 없는 상태였다. 다만, N59A의 경우 친화도는 큰 증가가 없는 반면 반응속도상수는 $2,200 \text{ s}^{-1}$ 에서 $7,000 \text{ s}^{-1}$ 으로 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0144] 8. 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)에 대한 친화도가 큰 돌연변이 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)와 반응속도상수가 증가하는 돌연변이 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)를 조합한 일산화탄소 탈수소효소(CO dehydrogenase)의 두 부위 돌연변이체(double mutant)의 경우

[0145] 실시예 7의 결과를 기반으로 R57와 N59 부분에 대한 돌연변이를 제작한 후 이를 야생형과 비교하였다. 하기 표 4에서 볼 수 있듯이 R57G:N59G 돌연변이체의 경우 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)에 대한 친화도 뿐만 아니라 반응속도가 증가하여 전체적인 반응속도 k_{cat}/K_m 값이 900에서 6,500으로 약 7배 이상 증가한 것을 확인할 수 있었고, 친화도와 반응속도가 동시에 개선된 돌연변이체를 얻을 수 있었다. 또한 R57G:N59L 돌연변이체의 경우 에틸 바이올로젠(ethyl viologen)에 대한 친화도가 약 10배 이상 증가한 것을 확인할 수 있었다.

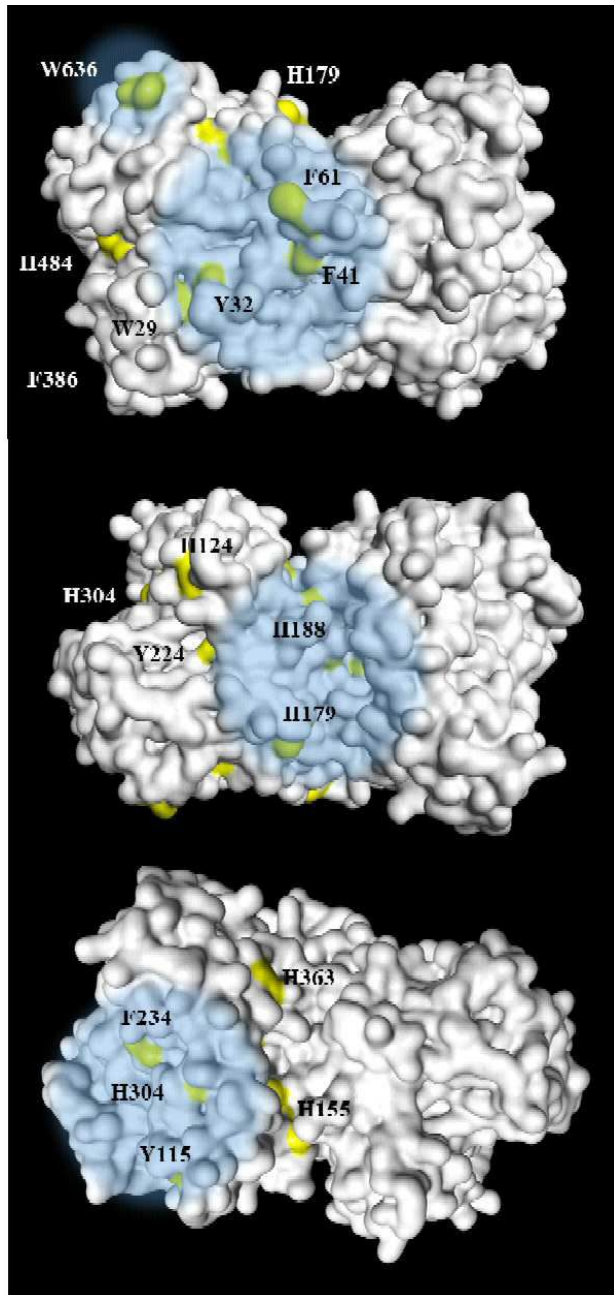
표 4

[0147]

CODH 종류	서열번호	K_m (mM)	효소 반응속도 상수 k_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$)
야생종 ChCODH-II	1	2.3	2,200	900
ChCODH-II R57E	20	0.7	1,600	2,400
ChCODH-II N59A	27	1.9	7,000	3,700
ChCODH-II R57E:N59G	33	1.7	100	60
ChCODH-II R57G:N59G	34	0.9	6,000	6,500
ChCODH-II R57G:N59L	35	0.2	2,000	9,200

도면

도면1



서열 목록

- <110> UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)
- <120> CARBON MONOXIDE DEHYDROGENASE HAVING INCREASED AFFINITY TOWARD ELECTRON MEDIATOR AND REACTION RATE AND USES THEREOF
- <130> PN134598KR
- <160> 35
- <170> KoPatent In 3.0

<210> 1
 <211> 1911
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> Carboxydotherrmus hydrogenoformans
 <220><221> gene
 <222> (1)..(1911)
 <223> Carbon monoxide dehydrogenase-2
 <400> 1

atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg 60

aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt 120

ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgcctgcaag gtccgtgccg tattaaccg 180

tttggcgtatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgaccg cggaagtgat cgttgcgcgt 240

ggtctggacc gtagcattgc ggccgggtgcg gcgggtcata gcggtcacgc gaagcacctg 300

gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt 360

accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag 420

gatattgcgc tggaagtgc gaaagcggcg ctggcggact tccatgagaa agataccccg 480

gttctgtggg tgaccaccgt tctgccgcg agccgtgtga aggttctgag cgcgcatggt 540

ctgatcccg cggttattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt 600

tgcgacgcgg atgcgcagaa cctgtctgtg ggtggcctgc gttgcagcct ggccggacctg 660

gcgggttgc acatgggcac cgacctggcg gatatcctgt ttggtacccc ggccgcggtg 720

gttacgaaa gcaacctggg cgtgtctgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt 780

cacaaccgg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg 840

cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaacgtg gttggtatct gctgcaccgg caacgaggtg 900

ctgatgcgtc acggtattcc ggctgtcacc cacagcgtta gccaggaaat ggcatgatac 960

accggcgcg tgacgcgat gatcctggat tatcagtca ttcaaccgag cgtggcgacc 1020

attgcggagt gcaccggtac caccgttatt accacatgg aatgagcaa aatcaccggt 1080

gcgacccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcaagca aatcctgcgt 1140

ctggcgattg atacctttaa acgtcgtgta ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag 1200

accaaagtgg ttccgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgtgag caagctgaac 1260

gcgaacgatc cgctgaaacc gctgattgac aacgtgggta acggtaacat ccgtggcgtg 1320

tgcctgttcg cgggttgcaa caacgttaag gtgccgcagg accaaaaactt taccaccatt	1380
gcgcgtaagc tgctgaaaca gaacgttctg gtggttcga cgggttcgg tcggggtgcg	1440
ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtggatg agctgtcgg cgacggtctg	1500
aaagcggttc tgaccgcgat cggatgaagcg aacggtctgg gtggcccgt gccgccggtg	1560
ctgcacatgg gtagctgcgt tgacaacagc cgtgcggtgg cgctggttc gccgctggcg	1620
aaccgtctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcggcg ggaagcgatg	1680
catgagaagg cgggtggcgat tggtagctgg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt	1740
ggtgtgctgc cgccgatcac cggcagcctg ccggtgacct aaatcctgac cagcagcgtt	1800
aaagatatta ccggtggcta ctcatcgtt gaactggacc cggagaccgc ggccggacaaa	1860
ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a	1911
<210> 2	
<211> 1902	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Carboxydothemus hydrogenoformans	
<220><221> gene	
<222> (1)..(1902)	
<223> Carbon monoxide dehydrogenase-4	
<400> 2	
atggataaaa gcaagttatc agtagatcct gtgatccga atttatatcg taaagccaga	60
gaggaaggga tttccactgt ttttgatcgt tatgaagcac agcagcctca gtgcggattt	120
gggcttacag gcctttgctg tcgtcattgc gtgcaggac cgtgccgat agatccgttt	180
ggggaaggac cgcaagcggg catttgcgtt gctaccgcc aggtaataac ggctcgaat	240
ctgctgcgtc aagtcacggc ggtgctgcc gcccatgtag accatgcgtg tgatgtctg	300
gaagttttgg acaaatcgc ccaaggtacg gaatcataca gtatcaaaga tcaagaaaag	360
ttaaagcagg tcgcttttac cttaggtata gataccgcta acaaacaga gcaggagatt	420
gttgaagaga tgtgccaat tatctatcgg gatcttgcca attctggtgc aacaccgatg	480
acatatctga aagccaactc tcctcgggaa cgccttgaga catgggaaaa attaggggtt	540
ctgcctcgta accagaccg tgaaatcaga gaagccttac accagactac aatggggatg	600
gatgcggacc cagtaaatct aatcttaaaa actattcgcc ttggtctggt tgatggtttt	660
gcgggtctca agttagcgac ggatttacag gacatcattt ttggcactcc ccagccagtt	720
gtcacagaag caaatctggg tgtactcaaa gaagattatg tgaatatcat agtcacggc	780

catgttccgt tacttagcga aaaaattgtt gaatggagca gaaagttaga agatgaggcg	840
aaaaaagcag gggcaaaagg aatcaatctt gcaggtatat gttgtactgg taacgaggtg	900
ttaatgcgtc aggggtgtacc gttagcaaca aatttcctgg cccaggagtt ggcgattatt	960
acgggggcag ttgacttaat ggtagtggat gttcagtgtat ttagccctc attagcagaa	1020
attgtctgtt gctatcatac ccgcttagtc actaccatgc cgattgtgaa aattccaggt	1080
gcggagcatg ttccgttcac cacagaaact gccgatgagg cctcgagca gattgtgcgt	1140
atggctatag agagttacca aaaacgcaat ccagccaagg tctacatccc cagggaaaaa	1200
gccaagtgtg tagcaggatt cagcgttgag gcaatagtaa aagcgttagc gaaactaaat	1260
cctgacgac cgttaaagcc cttaattgat aatattgtgt ctggcaacat tctgggtgtg	1320
gtcgccaccg ttggtgtgaa caatgtgaag gtcaagcatg attggttcca catagaatta	1380
gtaaaagaac taattaaaaa caatgtgtta gtggtgacta cagcgtgttc cgctcatgcg	1440
ttagcgaag cagcgttgat ggaccccgca gcagccgaat gggctggcga gggtttacga	1500
gccgtcttaa cggcaatagg cacggctaata gatttgggcg gcccgctgcc gcctgttttg	1560
cacatgggat cgtgtgttga taactcccga atcggggact tagtgatcgc cgtcgcaaac	1620
taccttaaag taagtccaaa agaccttccg attgcggctt ctgcacctga ataccagcat	1680
gaaaaggctt tgagcatcgg aacctgggcg gtagcgatgg gtattatgac ccacttgga	1740
gttgttccac ctgtggtcgg aagttaaaaa gttaccgta ttcttaccca agatgccgag	1800
gctttaatag gcggcaaat ttagtggaa acggacccat ataaagcagc agcgggcatc	1860
attgaacata ttaagctaa acgggctcta ctgaatttat aa	1902
<210> 3	
<211> 5369	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> pET-28	
<400> 3	
atccggatat agttcctcct ttcagcaaaa aaccctcaa gaccgttta gaggcccaa	60
ggggttatgc tagttattgc tcagcgggtg cagcagccaa ctcagcttcc ttccgggctt	120
tgtagcagc cggatctcag tgggtggtgt ggtggtgctc gattgcggcc gcaagcttgt	180
cgacggagct cgaattcgga tccgcgacct atttgcgtgc caccagtcac gctagccata	240
tggtgcccgc gcggcaccag gccgctgctg tgatgatgat gatgatggt gctgcccatg	300
gtatatctcc ttcttaaagt taaacaaaat tatttctaga ggggaattgt tatccgctca	360

caattcccct atagttagtc gtattaatit cgcgggatcg agatctcgat cctctacgcc	420
ggacgcacgc tggccggcat caccggcgcc acaggtgcgg ttgctggcgc ctatatcgcc	480
gacatcaccg atggggaaga tgggctcgc cacttcgggc tcatgagcgc ttgtttcggc	540
gtgggtatgg tggcaggccc cgtggccggg ggactgttgg gcgccatctc cttgcatgca	600
ccattccttg cggcggcggg gctcaacggc ctcaacctac tactgggctg cttcctaag	660
caggagtgcg ataagggaga gcgtcgagat cccggacacc atcgatggc gcaaacctt	720
tcgcggtatg gcatgatagc gcccgaaga gactcaattc aggggtgtga atgtgaaacc	780
agtaacgtta tacgatgtcg cagagtatgc cgtgtgtctc tatcagaccg tttcccgct	840
ggtgaaccag gccagccacg tttctgcgaa aacgcgggaa aaagtggaag cggcgatggc	900
ggagctgaat tacattccca accgcgtggc acaacaactg gcgggcaaac agtcgttgc	960
gattggcggt gccacctcca gtctggccct gcacgcgcgc tcgcaaatg tcgcggcgat	1020
taaactctgc gccgatcaac tgggtgccag cgtgggtgtg tcgatggtag aacgaagcgg	1080
cgtcgaagcc tgtaaagcgg cgggtgcacaa tcttctcgcg caacgcgtca gtgggctgat	1140
cattaactat ccgtggatg accaggatgc cattgctgtg gaagctgcct gcactaatgt	1200
tccggcgta tttcttgatg tctctgacca gacaccatc aacagtatta tttctccca	1260
tgaagacggt acgcgactgg gcgtggagca tctggtcgca ttgggtcacc agcaaatcgc	1320
gctgttagcg ggccattaa gttctgtctc ggcgctctg cgtctggctg gctggcataa	1380
atatctcact cgcaatcaaa ttcagccgat agcgggaacgg gaaggcgact ggagtgccat	1440
gtccggtttt caacaaacca tgcaaatgct gaatgagggc atcgttccca ctgcgatgct	1500
ggttgccaac gatcagatgg cgctgggcgc aatgcgcgc attaccgagt ccgggctgcg	1560
cgttggtgcg gatattcgg tagtgggata cgacgatacc gaagacagct catgttatat	1620
cccgcgta accaccatca aacaggattt tcgcctgctg gggcaaacca gcgtggaccg	1680
cttctgcaa ctctctcagg gccaggcggg gaagggaat cagctgttgc ccgtctcact	1740
ggtgaaaaga aaaaccaccc tggcgcccaa tacgaaacc gcctctccc gcgcgttggc	1800
cgattcatta atgcagctgg cagcacaggt ttcccactg gaaagcgggc agtgagcgca	1860
acgcaattaa tgtaagttag ctactcatt aggcaccggg atctcgaccg atgcccttga	1920
gagccttcaa ccagtcagc tcttccggg gggcgcgggg catgactatc gtcgccgcac	1980
ttatgactgt cttctttatc atgcaactcg taggacaggt gccggcagcg ctctgggtca	2040
ttttcggcga ggaccgcttt cgctggagcg cgacgatgat cggcctgtcg cttgcggtat	2100
tcggaatctt gcacgcctc gctcaagcct tcgtacttgg tcccgcacc aaacgtttcg	2160
gcgagaagca ggccattatc gccgcatgg cggccccacg ggtgcgcatg atcgtgctcc	2220

tgctgttag gacccggcta ggctggcggg gttgccttac tggttagcag aatgaatcac	2280
cgatacgcga gcgaacgtga agcgactgct gctgcaaaac gtctgcgacc tgagcaacaa	2340
catgaatggt cttcggtttc cgtgtttcgt aaagtctgga aacgcggaag tcagcgcctt	2400
gcaccattat gticcggatc tgcacgcag gatgctgctg gctaccctgt ggaacaccta	2460
catctgtatt aacgaagcgc tggcattgac cctgagtgat ttttctctgg tcccgcgcga	2520
tccataccgc cagtgtttta ccctcacaac gttccagtaa cgggcatgt tcatcatcag	2580
taaccggtat cgtgagcatc ctctctcgtt tcatcggtat cattaccccc atgaacagaa	2640
atccccctta cacggaggca tcagtacca aacaggaaaa aaccgcctt aacatggccc	2700
gctttatcag aagccagaca ttaacgttc tggagaaact caacgagctg gacgcgatg	2760
aacaggcaga catctgtgaa tcgcttcacg accacgtga tgagctttac cgcagctgcc	2820
tcgcgcgttt cggatgatgc ggtgaaaacc tctgacacat gcagctccc gagacggtca	2880
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcaggcgcg tcagcgggtg	2940
ttggcgggtg tcggggcgca gccatgacc agtcacgtag cgatagcgga gtgtatactg	3000
gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagtg caccatata gcggtgtgaa	3060
ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcacaggc gctcttccgc ttctcgtc	3120
actgactcgc tgcgctcgtt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg	3180
gtaatacgtt tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc	3240
cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggtccgc	3300
ccccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtca ggtggcgaaa cccgacagga	3360
ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agtcctctg tgcgctctcc tgttcgacc	3420
ctgccgtta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat	3480
agctcacgt gtaggtatct cagttcgtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg	3540
cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgtgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc	3600
aaccggtaa gacacactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga	3660
gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtgtt ggcctaacta cggctacact	3720
agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt	3780
ggtagctctt gatccggcaa acaaacacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag	3840
cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc cttgatctt ttctacgggg	3900
tctgacgtc agtgaacga aaactcacgt taagggattt tggatcatgaa caataaaact	3960

gtctgcttac ataaacagta atacaagggg tgttatgagc catattcaac gggaaacgtc 4020
 ttgctctagg ccgcgattaa attccaacat ggatgctgat ttatatgggt ataaatgggc 4080
 tcgcgataat gtcgggcaat cagggtgcgac aatctatcga ttgtatggga agcccgatgc 4140
 gccagagtgg tttctgaaac atggcaaagg tagcgttgcc aatgatgtta cagatgagat 4200
 ggtcagacta aactggctga cggaatttat gcctcttcgc accatcaagc attttatccg 4260
 tactcctgat gatgcatggt tactcaccac tgcgatcccc gggaaaacag cattccaggt 4320
 attagaagaa tatcctgatt caggtgaaaa tattgttgat gcgctggcag tgttcctgcg 4380

ccggttgcat tcgattcctg tttgtaattg tccttttaac agcgatcgcg tatttcgtct 4440
 cgctcaggcg caatcacgaa tgaataacgg tttggttgat gcgagtgatt ttgatgacga 4500
 gcgtaatggc tggcctgttg aacaagctcg gaaagaaatg cataaacttt tgccattctc 4560
 accggattca gtcgtcactc atggtgattt ctacttgat aaccttattt ttgacgaggg 4620
 gaaattaata ggttgatttg atgttgacg agtcggaatc gcagaccgat accaggatct 4680
 tgccatccta tggaactgcc tcggtgagtt ttctcttca ttacagaaac ggctttttca 4740
 aaaatatggt attgataatc ctgatatgaa taaattgcag ttcatattga tgctcgatga 4800

gtttttctaa gaattaattc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac 4860
 aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgaaattgta aacgttaata 4920
 ttttgtaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg 4980
 aaatcgga aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtggtgttc 5040
 cagtttgaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa 5100
 ccgtctatca gggcgatggc ccaactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttggggt 5160
 cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc cttaaaggag ccccgattt agagcttgac 5220

ggggaaagcc ggcaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta 5280
 gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg 5340
 cgccgctaca gggcgcgctc cattcgcca 5369

<210> 4
 <211> 7244
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pET28-ChCODH-2
 <400> 4

atccggatat agttcctcct ttacgaaaa aaccctcaa gaccggttta gaggccccaa 60

ggggttatgc tagttattgc tcagcgggtg cagcagccaa ctcagcttcc tticgggctt	120
tgtagcagc cggatctcag tgggtggtgt ggtggtgctc gaggcggcc gcaagcttgt	180
cgacggagct cgaattcgga tcctcaccac ggcagaccca gaccgcacg acgtcattg	240
atcgccgcca gcagtttgc cgccgcggtc tccgggtcca gttcaacgat gaagtagcca	300
ccggtaatat ctttaacgt gctggtcagg atttgggtca ccggcaggct gccggtgatc	360
ggcggcagca caccaatgtg ggtcggcaga ccgatggtaa ccgccagggt accaatcgcc	420
accgccttct catgcatcgc ttccgccgcg ctgcacaacca ccggcagacg atccaggcca	480
acgccagac ggttcgccag cgccgaacc agcgccaccg cacggctgtt gtcaacgcag	540
ctacccatgt gcagcaccgg cggcagcggg ccaccagac cgttcgcttc accgatcgcg	600
gtcagaaccg ctttcagacc gtcgccgcac agtcatcca cgttcgccgg gtccataaaa	660
ccgtgacgca tcagcgacc cgccaccgaa ccggtcgcaa ccaccagaac gttctgtttc	720
agcagcttac gcgcaatggt ggtaaagtgt tggctctgcg gcacctaac gttgttgcaa	780
cccgcgaaca ggcacacgcc accgatgta ccgttaacca cgttgtcaat cagcggtttc	840
agcggatcgt tcgcttcag cttgctcagc gcgttaatga tcgcttcggt gctgaagccc	900
gcaaccactt tggctttaat gttcgggatc tccaccggtt tacccttacg acgtttaaag	960
glatcaatcg ccagacgcag gatttgcttc gcgttctcaa ccgccgcttc ctccgcaaag	1020
ttcacatggg tcgaccggt gattttgctc atttccatgg tggtaataac ggtggtaccg	1080
gtgactccg caatggtcgc cagctcgggt tgaatgcact gataatccag gatcatcgcg	1140
tccagcgcg cggatgatcat cgccatttcc tggctaacgc tgtgggtgca cgccggaata	1200
ccgtgacgca tcagcacctc gttgccggtg cagcaaatac caaccacgtt gataccggtc	1260
gcaccgccg cagcgccctc gttttccatc tctttgctca cgctaacaat gatgtcgctc	1320
agaaccgggt tgtgaccgtg caccgcaacg ttcaccgcat ccgcttcag cagccccagg	1380
ttgctttcgg taaccaccgg cgccggggta ccaaaccagga tatccgcag gtcggtgccc	1440
atgtagcaac ccgccaggct cgccaggctg caacgcagge caccagcag caggttctgc	1500
gcatccggt cgcaacccat gctggtacgg tgcataatct ccgcgatttc gtgatcaata	1560
cccgccggga tcagaccatg cgcgtcaga accttcacac ggctcggcgg cagaacgggtg	1620
gtacccaca gaaccgggtt atttttctca tggaaagtcc ccagcgccgc tticgcaact	1680
tccagcgcaa tatcctcgtc tttttggcct tcggtcggaa taccagacg cttcgcatg	1740
ctgtgcagtt tggtaggtc cttaatacata tagctcgccg ctttgccctg caccgtttc	1800

ttcagggtgt gcgccagggtg ctctgcatga ccgctatgac ccgccgcacc cgccgcaatg	1860
ctacgggtcca gaccacgcgc aacgatcact tccgcggtcg caccgcaaat gccactttc	1920
ggctcatcgc caaacgggtt aatacggcac ggaccttgca ggacgtgacg gcagcacaga	1980
ccggttttcgc cgaacccgca ctgcggcttc atcgctcgt aacgatccca cacggtttga	2040
ataccctcac gtttcgcttt atccagcatt tgttgaaccg cacggtcggt gctcttcaga	2100
ttttgtttcg ccatatggct gccgcgcggc accaggccgc tgctgtgatg atgatgatga	2160
tggctgctgc ccatgggtata tctccttctt aaagttaaac aaaattatit ctagagggga	2220
attgttatcc gtcacaatt cccctatagt gattcgtatt aatttcgcgg gatcgagatc	2280
tcgatcctct acgccggacg catcgtggcc ggcatcaccg gcgccacagg tgcggttgct	2340
ggcgccctata tcgccgacat caccgatggg gaagatcggg ctgccactt cgggctcatg	2400
agcgttgttt tcggcgtggg tatgttgga ggccccgtgg ccgggggact gttgggcgcc	2460
atctccttgc atgcaccatt ccttcggcg gcggtgtca acggcctcaa cctactactg	2520
ggctgcttcc taatgcagga gtcgcataag ggagagcgtc gagatcccg acaccatcga	2580
atggcgcaaa acctttcgcg gtatggcatg atagcgcccg gaagagagtc aattcagggt	2640
ggtgaatgtg aaaccagtaa cgttatacga tgcgcagag tatgccggtg tctcttatca	2700
gaccgtttcc cgcgttgtga accaggccag ccacgtttct gcgaaaacgc gggaaaaagt	2760
ggaagcggcg atggcggagc tgaattacat tccaaccgc gtggcacaac aactggcggg	2820
caaacagtgc ttgtgattg gcgttgccac ctccagtctg gccctgcacg cgccgtcga	2880
aattgtcgcg gcgattaaat ctgcgcga tcaactgggt gccagcgtgg tgggtgtgat	2940
ggtagaacga agcggcgtcg aagcctgtaa agcggcgggt cacaatcttc tcgcgcaacg	3000
cgtcagtggg ctgatcatta actatccgt ggatgaccag gatgccattg ctgtggaagc	3060
tgctgcact aatgttcgg cgttatttct tgatgtctct gaccagacac ccatcaacag	3120
tattattttc tccatgaag acggtacgcg actgggcgtg gagcatctgg tcgcatggg	3180
tcaccagcaa atcgctgtg tagcgggcc attaatctct gtctcggcgc gtctgcgtct	3240
ggctggctgg cataaatatc tactcga tcaaatcag ccgatagcgg aacgggaagg	3300
cgactggagt gccatgtccg gttttcaaca aaccatgcaa atgctgaatg agggcatcgt	3360
tcccactgcg atgctggtg ccaacgatca gatggcgtg ggcgcaatgc gcgcattac	3420
cgagtccggg ctgcgcgtg gtgcggatat ctcggtagt ggatagcagc ataccgaaga	3480
cagctcatgt tatatccgc cgtaaacac catcaaacag gattttcgcc tgctggggca	3540
aaccagcgtg gaccgtttg tgcaactctc tcagggccag gcggtgaagg gcaatcagct	3600
gttgcgcgtc tactggtga aaagaaaaac caccctggcg cccaatacgc aaaccgcctc	3660

tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag	3720
cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtaa gttagctcac tcattaggca cgggatctc	3780
gaccgatgcc cttgagagcc ttcaaccag tcagctcctt ccggtgggcg cggggcatga	3840
ctatcgtcgc cgcacttatg actgtcttct ttatcatgca actcgtagga caggtgccgg	3900
cagcgtcttg ggtcattttc ggcgaggacc gctttcgtg gagcgcgacg atgatcgcc	3960
tgtcgttgc ggtattcgga atcttgcacg ccctcgtca agccttcgtc actggccccg	4020
ccaccaaacg tticggcgag aagcaggcca ttatcgccgg catggcggcc ccacgggtgc	4080
gcatgatcgt gtcctgtcg ttgaggaccc ggctaggtg gcgggggttgc cttactggtt	4140
agcagaatga atcacgata cgcgagcga cgtgaagcga ctgctgtgc aaaacgtctg	4200
cgacctgagc aacaacatga atggcttctg gtttcgtgt ttcgtaaagt ctggaaacgc	4260
ggaagtcagc gccctgcacc attatgttcc ggatctgcat cgcaggatgc tgcctggctac	4320
ctgttggaac acctacatct gtattaacga agcgttgga ttgacctga gtgattttc	4380
tctggccccg ccgcatccat accgccagtt gttaccctc acaacgttcc agtaaccggg	4440
catgttcate atcagtaacc cgtatcgtga gcatcctctc tcgtttcacc ggtatcatta	4500
cccccatgaa cagaaatccc cttacacgg aggcacagtc gaccaaacag gaaaaaacg	4560
cccttaacat ggcccgttt atcagaagcc agacattaac gcttctggag aaactcaacg	4620
agctggagc ggatgaacag gcagacatct gtgaatcgt tcacgaccac gctgatgagc	4680
tttaccgcag ctgcctcgcg cgtttcgtg atgacggtga aaacctctga cacatgcagc	4740
tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg	4800
gcgcgtcagc ggggtgttggc ggggtgtcggg gcgcagccat gaccagtc cgtagcgata	4860
gcggagtgtg tactggctta actatgcggc atcagagcag attgtactga gagtgcacca	4920
tatatcggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgtct	4980
tccgttctct cgtcactga ctgcgtcgc tcggtcgttc ggctgcggc agcggtatca	5040
gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac	5100
atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcgttt	5160
ttccatagge tccgcccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgtcaag tcagaggtgg	5220
cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagtc cctcgtcgc	5280
tctcctgttc cgacctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcgggaagc	5340
gtggcgcttt ctcatagtc acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt cgttcgtcc	5400
aagctgggct gtgtgcagca accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac	5460
tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt	5520

aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct	5580
aactacggct acactagaag gacagtatit ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc	5640
ttcggaaaaa gagttagtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgtgg tagcggtggt	5700
ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg	5760
atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc	5820
atgaacaata aaactgtctg cttacataaa cagtaataca aggggtgtta tgagccatat	5880
tcaacgggaa acgtcttgct ctaggccgcg attaaattcc aacatggatg ctgatttata	5940
tgggtataaa tgggctcgcg ataatgtcgg gcaatcaggt gcgacaatct atcgattgta	6000
tgggaagccc gatgcgccag agttgtttct gaaacatggc aaaggtagcg ttgccaatga	6060
tgttacagat gagatggica gactaaactg gctgacggaa tttatgcctc ttccgaccat	6120
caagcatitt atccgtactc ctgatgatgc atggttactc accactgcga tccccgggaa	6180
aacagcattc caggtattag aagaatatcc tgattcaggt gaaaatatg ttgatgcgct	6240
ggcagtgttc ctgcgccggt tgcatctgat tctgtttgt aattgtcctt ttaacagcga	6300
tcgctatttt cgtctcgctc aggcgcaatc acgaatgaat aacggtttgg ttgatgcgag	6360
tgattttgat gacgagcgta atggctggcc tgttgaacaa gtcaggaaag aaatgcataa	6420
acttttgcca ttctaccggg attcagtcgt cactcatggt gatttctcac ttgataacct	6480
tatttttgac gaggggaaat taataggttg tattgatgtt ggacgagtcg gaatcgcaga	6540
ccgataccag gatcttgcca tctatggaa ctgcctcggg gagttttctc cttcattaca	6600
gaaacggctt tttcaaaaat atggtattga taatcctgat atgaataaat tgcagtttca	6660
tttgatgctc gatgagtttt tctaagaatt aattcatgag cggatacata ttgtaatgta	6720
tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgaaa	6780
ttgtaaacgt taatattttg ttaaaattcg cgttaaatit ttgttaaate agctcatitt	6840
ttaaccaata ggccgaaatc ggcaaaatcc cttataaatc aaaagaatag accgagatag	6900
ggttgagtgt tgttccagtt tggaacaaga gtccactatt aaagaacgtg gactccaacg	6960
tcaaaggcg aaaaaccgtc tatcaggcg atggccact acgtgaacca tcaccctaat	7020
caagtttttt ggggtcgagg tgccgtaaag cactaaatcg gaaccctaaa gggagcccc	7080
gatttagagc ttgacgggga aagccggcga acgtggcgag aaaggaaggg aagaaagcga	7140
aaggagcggg cgtagggcg ctggcaagt tagcggtcac gctgcgcgta accaccacac	7200
ccgccgcgt taatgcgccg ctacaggcg cgtccattc gcca	7244

<210> 5

<211> 7195

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pET28-ChCODH-4

<400> 5

atccggatat agttcctcct ttcagcaaaa aaccctcaa gaccgttta gaggcccaa 60

ggggttatgc tagttattgc tcagcgggtg cagcagccaa ctacagcttc ttccgggctt 120

tgtagtagc cggatctcag tggtaggtg ggtggtgctc gagttataaa ttcagtagag 180

cccgtttagc cttaatatgt tcaatgatgc ccgtgctgc tttatatggg tccgtttcca 240

cataaaattt gccgcctatt aaagcctcgg catcttgggt aagaatacgg gtaacttttg 300

aacttccgac cacaggtgga acaactccca agtgggtcat aatacccatc gctaccgccc 360

aggttccgat gctcaaagcc ttttcatgct ggtattcagg tgcagaagcc gcaatcgga 420

ggtcttttgg acttacttta aggtagtttg cgacggcgat cactaagtcc ccgattcggg 480

agttatcaac acacgatccc atgtcaaaa caggcggcag cgggccgccc aaatcattag 540

ccgtgcctat tgccgttaag acggctcgta aaccctgcc agccatttcg gctgctgcgg 600

ggtccatcaa gcctgcttc gctaacgat gagcggaaca gcctgtagtc accactaaca 660

cattgttttt aattagtctt tttactaatt ctatgtggaa ccaatcatgc ttgaccttca 720

cattgttaca accaacggtg gcgaccacac ccagaatgtt gccagacaca atattatcaa 780

ttaagggtt taacggatcg tcaggattta gtttcgctaa cgcttttact attgcctcaa 840

cgctaatcc tgctacaact ttggcttttt cctggggat gtagaccttg gctggattgc 900

gtttttggta actctctata gccatacgca caatctgctg cgaggcctca tcggcagttt 960

ctgtggtgaa cggaacatgc tccgcacctg gaattttcac aatcggcatt gtagtgacta 1020

agcgggtatg atagcaagca gcaatttctg ctaatgaggg cataatacac tgaacatcca 1080

ctaccattaa gtcaactgcc cccgtaataa tcgccaactc ctgggccagg aagtttgttg 1140

ctaacgttac accctgacgc attaacacct cgttaccagt acaacatata cctgcaagat 1200

tgattccttt tgccctgct ttttgcct catcttccaa ctttctgctc cattcaacaa 1260

tttttctgct aagtaacgga acatggccgt ggactatgat attcacataa tcttctttga 1320

gtacaccag atttgcttct gtgacaactg gctggggagt gccaaaaatg atgtcctgta 1380

aatccgtcgc taacttgaga cccgcaaac catcaaccag accaaggcga atagttttta 1440

agattaaatt tactgggtcc gcatccatcc ccattgtagt ctggtgtaag gcttctctga 1500

tttcacggtc tgggttacga ggcagaaccc ctaatttttc ccatgtctca aggcgttccc	1560
gaggagagtt ggctttcaga taggtcatcg gtgttgacc agaattggca aaatcccgat	1620
agataatttg gcacatctct tcaacaatct cctgctctgt tttgttagcg gtatctatac	1680
ctaaggtaaa agcgacctgc tttaactttt ctgcatcttt gatactgtat gattccgtac	1740
cttgggcgat ttgttccaaa acttcagca catcatacgc atggtctaca tgggcggcag	1800
caccgcctgt gacttgacgc agcagattgc gagccgttat tacctcggcg gtagcaccgc	1860
aaatgcccgc ttgcggtcct tcccaaacg gatctatgcg gcacggtccc tgcacgcaat	1920
gacgacagca aaggcctgta agcccaaatc cgcactgagg ctgctgtgct tcataacgat	1980
caaaaacagt ggaaatccct tcctctctgg ctttacgata taaattcggg atcacaggat	2040
ctactgataa ctgtctttta tccatatggc tgccgcgcgg caccaggccg ctgctgtgat	2100
gatgatgatg atggctgtcg cccatgggat atctccttct taaagttaaa caaaattatt	2160
tctagagggg aattgttacc cgctcacaat tcccctatag tgagtcgtat taatttcgcg	2220
ggatcgagat ctgatactc tacgccggac gcatcgtggc cggcatcacc ggcgccacag	2280
gtgcggttgc tggcgctat atcgccgaca tcaccgatgg ggaagatcgg gctcgccact	2340
tcgggctcat gagcgcttgt ttcggcgtgg gtatggtggc aggccccgtg gccgggggac	2400
tgttgggcgc catctccttg catgcacat tccttgcggc ggcggtgctc aacggcctca	2460
acctactact gggctgcttc ctaatgcagg agtcgcataa gggagagcgt cgagatcccg	2520
gacaccatcg aatggcgcaa aacctttcgc ggtatggcat gatagcgccc ggaagagagt	2580
caattcaggg tggatgaatg gaaaccagta acgttatcgc atgtcgaga gtatgccggt	2640
gtctcttacc agaccgtttc ccgctgtgtg aaccaggcca gccacgtttc tgcgaaaacg	2700
cgggaaaaag tggaagcggc gatggcggag ctgaattaca ttccaaccg cgtggcacia	2760
caactggcgg gcaaacagtc gttgtgatt ggcgttgcca cctccagtct ggccctgcac	2820
gcgcgctgc aaattgtgc ggcgattaaa tctcgcccg atcaactggg tgccagcgtg	2880
gtggtgtcga tggtagaacg aagcggcgtc gaagcctgta aagcggcggg gcacaatctt	2940
ctcgcgcaac gcgtcagtg gctgatcatt aactatccgc tggatgacca ggatgccatt	3000
gctgtggaag ctgcctgcac taatgttccg gcgttatctt ttgatgtctc tgaccagaca	3060
cccatcaaca gtattatctt cteccatgaa gacggtacgc gactgggcgt ggagcatctg	3120
gtcgcatagg gtcaccagca aatcgcgctg ttagcgggcc cattaaagttc tgtctcggcg	3180
cgtctgcgtc tggttggtcg gcataaata ctcaactgca atcaaattca gccgatagcg	3240

gaacgggaag gcgactggag tgccatgtcc ggttttcaac aaacatgca aatgctgaat	3300
gagggcatcg ttcccactgc gatgctggtt gccaacgac agatggcgct gggcgcaatg	3360
cgcgccatta ccgagtccgg gctgcgcgtt ggtgcggata tctcggtagt gggatacgac	3420
gataccgaag acagctcatg ttatatcccg ccgttaacca ccatcaaaca ggattttcgc	3480
ctgctggggc aaaccagcgt ggaccgcttg ctgcaactct ctcagggcca ggcggtgaag	3540
ggcaatcagc tgttgcccg ctcactggtg aaaagaaaaa ccaccctggc gcccaatacg	3600
caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc	3660
cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgta agttagctca ctcattaggc	3720
accgggatct cgaccgatgc cttgagagc cttcaacca gtcagctcct tccggtgggc	3780
gcggggcatg actatcgtcg ccgcacttat gactgtcttc tttatcatgc aactcgtagg	3840
acaggtgccg gcagcgtctt gggtcatttt cggcaggac cgctttcgtt ggagcgcgac	3900
gatgatcggc ctgtcgcttg cggtaattcg aatcttgac gccctcgctc aagccttcgt	3960
cactggtccc gccaccaaac gtttcggcga gaagcaggcc attatcgccg gcatggcggc	4020
cccacgggtg cgcatgatcg tgctcctgtc gttgaggacc cggctaggct ggcgggggtt	4080
cttactggt tagcagaatg aatcaccgat acgcgagcga acgtgaagcg actgctgctg	4140
caaaacgtct gcgacctgag caacaacatg aatggtcttc ggtttccgtg tttcgtaaag	4200
tctggaaacg cggaagtcag gcacctgcac cattatgttc cggatctgca tcgcaggatg	4260
ctgctggcta cctgttgga cactacatc tgtattaacg aagcgtggc attgaccctg	4320
agtgttttt ctctggtccc gccgcacca taccgccagt tgtttaccct cacaacgttc	4380
cagtaaccgg gcatgttcat catcagtaac ccgtatcgtg agcatcctct ctcgtttcat	4440
cggatcatt acccccatga acagaaatcc cccttacag gaggcacag tgaccaaaaca	4500
ggaaaaaac gcccttaaca tggcccgtt tatcagaagc cagacattaa cgcttctgga	4560
gaaactcaac gagctggacg cggatgaaca ggcagacatc tgtgaatcgc ttcacgacca	4620
cgctgatgag ctttaccgca gctgcctcgc gcgtttcggg gatgacgggtg aaaacctctg	4680
acacatgcag ctcccggaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca	4740
agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggcgcagcca tgaccagtc	4800
acgtagcgt agcggagtgt atactggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg	4860
agagtgcacc atatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca	4920
tcaggcgctc ttccgcttcc tcgtcactg actcgctcgc ctcggtcgtt cggctgcggc	4980
gagcgtatc agctcactca aaggcggtaa tacggttacc cacagaatca ggggataacg	5040
caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt	5100

tgctggcggtt tticcatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa	5160
gtcagagggtg gcgaaccccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct	5220
ccctcgtgcg ctctctgtt ccgacctgc cgttaccgg atacctgtcc gcctttctcc	5280
cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg	5340
tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccct tcagcccgac cgtgcgct	5400
tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cgtaagaca cgacttatcg cactggcag	5460
cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgtgctaca gatttctga	5520
agtgggtggc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga	5580
agccagttac cticggaaaa agagtggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgtg	5640
gtagcgggtg ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag	5700
aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag	5760
ggattttggc catgaacaat aaaactgtct gcttacataa acagtaatac aaggggtgtt	5820
atgagccata ttcaacggga aacgtcttgc tctagccgc gattaaattc caacatggat	5880
gctgatttat atgggtataa atgggctcgc gataatgtcg ggcaatcagg tgcgacaatc	5940
tatcgattgt atgggaagcc cgatgcgcca gatttgtttc tgaacatgg caaaggtagc	6000
gttgccaatg atgttacaga tgagatgtc agactaaact ggctgacgga atttatgcct	6060
cttcgacca tcaagcattt tatecgtaact cctgatgatg catggttact caccactgcg	6120
atccccggga aaacagcatt ccaggtatta gaagaatgc ctgattcagg tgaaaatatt	6180
gttgatgcgc tggcagtgtt cctgcgccgg ttgcattcga ttctgtttg taattgtcct	6240
tttaacagcg atcgctatt tcgtctcgt caggcgcaat cacgaatgaa taacggtttg	6300
gttgatgcga gtgatttga tgacgagcgt aatggctggc ctgttgaaca agtctggaaa	6360
gaaatgcata aacttttgcc attctcaccg gattcagtcg tcaactcatg tgattttctc	6420
cttgataacc ttatttttga cgaggggaaa ttaatagggt gtattgatgt tggacgagtc	6480
ggaatgcgag accgatacca ggatcttgcc atcctatgga actgcctcgg tgagttttct	6540
ccttcattac agaaacggct ttttcaaaaa tatggtattg ataactctga tatgaataaa	6600
ttgcagtttc atttgatgct cgatgagttt ttctaagaat taattcatga gcggatacat	6660
atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttcg cgacatttc cccgaaaagt	6720
gccacctgaa attgtaacg ttaatatttt gttaaaattc gcgttaaatt tttgttaaat	6780
cagtcattt ttaaccaat aggccgaaat cggcaaaatc cttataaat caaaagaata	6840
gaccgagata gggttgagtg ttgttccagt ttggaacaag agtccactat taaagaacgt	6900
ggactccaac gtcaaaggcg gaaaaaccgt ctatcagggc gatggccac tacgtgaacc	6960

atcacccctaa tcaagttttt tggggtcgag gtgccgtaaa gcactaaatc ggaaccctaa 7020

aggagagcccc cgatttagag cttgacgggg aaagccggcg aacgtggcga gaaaggaagg 7080

gaagaaagcg aaaggagcgg gcgctagggc gctggcaagt gtagcgggtca cgctgcgcgt 7140

aaccaccaca cccgccgcgc ttaatgcgcc gctacagggc gcgtccatt cgcca 7195

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F41A-F

<400> 6

cagtgcggtg cgggcgaaac cggctctgtgc t 31

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F41A-R

<400> 7

ggtttcgccc gcaccgcact gcggcttcat cg 32

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R57G-F

<400> 8

ggtccgtgcg gtattaacct gtttggcgat 30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R57G-R

<400> 9

cgggttaata ccgcacggac cttgcaggca 30

<210> 10

<211> 30
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> N59L-F
 <400> 10
 tgccgtattc ttccgtttgg cgatgagccg 30
 <210> 11
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N59L-R
 <400> 11
 gccaaacgga agaatacggc acggaccttg 30
 <210> 12
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> R57G/N59L-F
 <400> 12
 tgcggtattc ttccgtttgg cgatgagccg 30
 <210> 13
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> R57G/N59L-R
 <400> 13
 gccaaacgga agaatacggc acggaccttg 30
 <210> 14
 <211> 1911
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ChCODH-2 R57A
 <400> 14

atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg	60
aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt	120
ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgcctgcaag gtccgtgcgc tattaacccg	180
tttggcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgaccg cggaagtgat cgttgcgct	240
ggtctggacc gtagcattgc ggcgggtgcg gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg	300
gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt	360
accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag	420
gatatgtcgc tggaaagtgc gaaagcggcg ctggcgact tccatgagaa agataccccc	480
gttctgtggg tgaccaccgt tctgccgccg agccgtgtga aggttctgag cgcgcatggt	540
ctgatcccgg cgggtattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt	600
tgcgacgagg atgcgcagaa cctgtctgtg ggtggcctgc gttgcagcct ggcgacactg	660
gcgggttgc acatgggcac cgacctggcg gatatcctgt ttggtacccc ggcgccggtg	720
gttaccgaaa gcaacctggg cgtgtgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt	780
cacaaccggg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg	840
cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaacgtg gttggtatit gctgcaccgg caacgaggtg	900
ctgatgcgtc acggtattcc ggctgcacc cacagcgtta gccaggaaat ggcgatgac	960
accggcgcg cggacgcgat gatcctggat tatcagtca ttcaaccgag cgtggcgacc	1020
attgcggagt gcaccgttac caccgttatt accaccatgg aaatgagcaa aatcaccggt	1080
gcgacccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcgaagca aatcctgcgt	1140
ctggcgattg atacctttaa acgtcgtgaag ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag	1200
accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgctgag caagctgaac	1260
gcgaacgac cgtgaaacc gctgattgac aacgtgttga acggtaacat ccgtggcgtg	1320
tgcctgttcg cgggttgcaa caacgttaag gtccgcagg accaaaactt taccaccatt	1380
gcgcgtaagc tgcgaaaca gaacgttctg gtggttgca cgggttcgg tgcgggtgcg	1440
ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtggatg agctgtgcgg cgacgtctg	1500
aaagcggttc tgaccgcgat cggtaagcg aacgtctggt gtggcccgt gccgccggtg	1560
ctgcacatgg gtagctgcgt tgacaacagc cgtgcggtgg cgctggttgc ggcgctggcg	1620
aaccgtctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgcggc ggaagcgatg	1680
catgagaagg cgggtggcgat tggtaacctg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt	1740
ggtgtgctgc cgccgatcac cggcagcctg ccggtgaccc aaatcctgac cagcagcgtt	1800

aaagatatta ccggtggcta cttcatcggt gaactggacc cggagaccgc ggccgacaaa 1860

ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a 1911

<210> 15

<211> 1911

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ChCODH-2 K98I

<400> 15

atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg 60

aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt 120

ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgcctgcaag gtccgtgccg tattaacccg 180

tttggcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgaccg cggagtgat cgttgcgcgt 240

ggtctggacc gtagcattgc ggccgggtgcg gcgggtcata gcggtcatgc gatacacctg 300

gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt 360

accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag 420

gatattgcgc tggaagtgc gaaagcggcg ctggcggact tccatgagaa agataccccg 480

gttctgtggg tgaccaccgt tctgccgccg agccgtgtga aggttctgag cgcgcagtgt 540

ctgatcccg cgggtattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt 600

tgcgacgcgg atgcgcagaa cctgtctgtg ggtggcctgc gttgcagcct ggccggacctg 660

gcgggttgct acatgggcac cgacctggcg gatatcctgt ttggtacccc ggccgccggtg 720

gttacgaaa gcaacctggg cgtgtctgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt 780

cacaaccgg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg 840

cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaactg gttggtatct gctgcaccgg caacgaggtg 900

ctgatgcgtc acggtattcc ggctgtcacc cacagcgtta gccaggaaat ggcatgac 960

accggcgcg cggacgcgat gatcctggat tatcagtga ttcaaccgag cgtggcgacc 1020

attgcggagt gcaccgttac caccgttatt accaccatgg aaatgagcaa aatcaccggt 1080

gcgacccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcgaagca aatcctgcgt 1140

ctggcgattg atacctttaa acgtcgtgaag ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag 1200

accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgtgag caagctgaac 1260

gcgaacgac cgtgaaacc gctgattgac aacgtggtta acggtaacat ccgtggcgtg 1320

tgccgtttcg cgggttgcaa caacgttaag gtgccgcagg accaaaactt taccaccatt 1380

gcgcgtaagc tgctgaaaca gaacgttctg gtggttgcca ccggttgcgg tgcgggtgcg 1440
ctgatgcgtc acggttttat ggacccggcg aacgtggatg agctgtgcgg cgacggtctg 1500

aaagcggttc tgaccgcgat cggatgaagcg aacggtcttg gtggcccgt gccgcccgtg 1560
ctgcacatgg gtagctgcgt tgacaacagc cgtgcggtgg cgctggttgc ggcgctggcg 1620
aacctcttgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgcggc ggaagcgatg 1680
catgagaagg cggatggcgat tggatccttg gcggttacca tcggtctgcc gacccacatt 1740
ggtgtgctgc cgccgatcac cggcagcctg ccggtgacct aaatcctgac cagcagcgtt 1800
aaagatatta ccggtggcta cttcatcgtt gaactggacc cggagaccgc ggcggacaaa 1860
ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a 1911

<210> 16

<211> 1911

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ChCODH-2 H188A

<400> 16

atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg 60
aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt 120
ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgcctgcaag gtccgtgccg tattaacccg 180
tttggcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgaccg cggaagtgat cgttgcgcgt 240
ggtctggacc gtagcattgc ggcgggtgcg gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg 300

gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt 360
accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag 420
gatattgcgc tggaagtgc gaaagcggcg ctggcggact tccatgagaa agataccccg 480
gttctgtggg tgaccaccgt tctgccgcg agccgtgtga aggttctgag cgcgcatggt 540
ctgatcccgg cgggtattga tgccgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt 600
tgcgacgcgg atgcgcagaa cctgctgctg ggtggcctgc gttgcagcct ggcggacctg 660
gcgggttctg acatgggcac cgacctggcg gatatcctgt ttggtacccc ggcgccggtg 720

gttacgaaa gcaacctggg cgtgctgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt 780
cacaacccgg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg 840
cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaactg gttggtatit gctgcaccgg caacgaggtg 900
ctgatgcgtc acggtattcc ggcgtgcacc cacagcgtta gccaggaaat ggcgatgatc 960

accggcgcgc tggacgcgat gatcctggat tatcagtga ttcaaccgag cgtggcgacc 1020
attgcggagt gcaccgttac caccgttatt accaccatgg aaatgagcaa aatcaccggt 1080
gcgacccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcaagca aatcctgcgt 1140

ctggcgattg atacctttaa acgtcgtgtaagggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag 1200
accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgtgag caagctgaac 1260
gcgaacgata cgtgaaacc gctgattgac aacgtggtta acgtaacat cgtggcggtg 1320
tgcctgttcg cgggttgcaa caacgttaag gtccgcagg accaaaactt taccaccatt 1380
gcgctgaagc tgcgaaaca gaacgttctg gtggttcga ccggttcggtg tgcgggtgcg 1440
ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtggatg agctgtgcgg cgacggtctg 1500
aaagcggttc tgaccgcgat cgggtgaagcg aacggtctgg gtggcccgt gccgccggtg 1560

ctgcacatgg gtagctgcgt tgacaacagc cgtgcggtgg cgtggttgc ggcgctggcg 1620
aacgctctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgcggc ggaagcgatg 1680
catgagaagg cgggtggcgat tggtagctgg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt 1740
ggtgtgctgc cccgatcac cggcagcctg ccggtgaccc aaatcctgac cagcagcgtt 1800
aaagatatta ccggtggcta cttcatcgtt gaactggacc cggagaccgc ggcggacaaa 1860
ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a 1911

<210> 17
<211> 1911
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> ChCODH-2 Y32A
<400> 17

atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg 60
aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgtggcgagg cgatgaagcc gcagtgcggt 120
ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgcctgcaag gtccgtgccg tattaaccg 180
tttggcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgacc cggaagtgat cgttgcgcgt 240
ggtctggacc gtagcattgc ggcgggtgcg gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg 300
gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt 360

accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag 420
gatattgcgc tggaagtgc gaaagcggcg ctggcgact tccatgagaa agatacccg 480
gttctgtggg tgaccaccgt tctgccgccg agccgtgtga aggttctgag cgcgcatggt 540

ctgatcccg cgggtattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt 600
 tgcgacgcgg atgcgcagaa cctgctgctg ggtggcctgc gttgcagcct ggcggacctg 660
 gcgggttgct acatgggcac cgacctggcg gatatcctgt ttggtacccc ggcgccggtg 720
 gttaccgaaa gcaacctggg cgtgctgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt 780

cacaaccgg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg 840
 cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaacgtg gttggtatit gctgcaccgg caacgaggtg 900
 ctgatgcgtc acggtattcc ggcgtgcacc cacagcgtta gccaggaaat ggcgatgac 960
 accggcgcg tggacgcgat gatcctggat tatcagtca ttcaaccgag cgtggcgacc 1020
 attgcggagt gcaccggtac caccgttatt accacatgg aaatgagcaa aatcacgggt 1080
 gcgacctatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcaagca aatcctgcgt 1140
 ctggcgattg atacctttaa acgtcgtaag ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag 1200

accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgctgag caagctgaac 1260
 gcgaacgatc cgtgaaacc gctgattgac aacgtggtta acgtaacat ccgtggcgtg 1320
 tgcctgttcg cgggttgcaa caacgttaag gtgccgcagg accaaaactt taccaccatt 1380
 gcgcgtaagc tgctgaaaca gaacgttctg gtggttgca cgggttgagg tgcgggtgcg 1440
 ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtggatg agctgtgcgg cgacggtctg 1500
 aaagcggttc tgaccgcgat cgggtgaagcg aacggtctgg gtggcccgt gccgccggtg 1560
 ctgcacatgg gtagctgcgt tgacaacagc cgtgcggtgg cgctggttgc ggcgctggcg 1620

aacgctctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgcggc ggaagcgatg 1680
 catgagaagg cgggtggcgt tggtacctgg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt 1740
 ggtgtgctgc cgccgatcac gcgcagcctg ccggtgacct aaatcctgac cagcagcgtt 1800
 aaagatatta ccggtggtta ctcatcgtt gaactggacc cgagaccgc ggcggacaaa 1860
 ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a 1911

<210> 18

<211> 1911

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ChCODH-2 H179A

<400> 18

atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg 60
 aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt 120

ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgcctgcaag gtccgtgccg tattaacccg	180
tttggcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgaccg cggaagtgat cgttgcgcgt	240
ggtctggacc gtagcattgc ggcggtgctg gcggtcata gcggtcatgc gaagcacctg	300
gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcgcgca gctatatgat taaggaccgt	360
accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag	420
gatattgcgc tggaagtgc gaaagcggcg ctggcggact tccatgagaa agatacccg	480
gttctgtggg tgaccaccgt tctgccgcg agccgtgtga aggttctgag cgcggctggt	540
ctgatcccg cggtattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt	600
tgcgacgcg atgcgcagaa cctgtctgtg ggtggcctgc gttgcagcct ggccggacctg	660
gcgggttgc acatgggcac cgacctggcg gatatcctgt ttggtacccc ggcgccggtg	720
gttacgaaa gcaacctggg cgtgtgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt	780
cacaacccg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg	840
cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaacgtg gttggtatct gctgcaccgg caacgaggtg	900
ctgatgcgtc acggtattcc ggcgtgcacc cacagctta gccaggaaat ggcgatgatc	960
accggcgcg tggacgcgat gatcctggat tatcagtca ttcaaccgag cgtggcgacc	1020
attgcggagt gcaccgtac caccgttatt accaccatgg aatgagcaa aatcaccgt	1080
gcgacccatg tgaactttg ggaggaagcg gcggttga acgcaagca aatcctgcgt	1140
ctggcgattg ataccttta acgtcgtgta ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag	1200
accaaagtgg ttgcgggctt cagcacgaa gcgatcatta acgcgtgag caagctgaac	1260
gcgaacgatc cgctgaaacc gctgattgac aacgtggtta acgtaacat ccgtggcgtg	1320
tgcctgttcg cgggttgcaa caacgttaag gtccgcagg accaaaactt taccaccatt	1380
gcgcgtaagc tgctgaaaca gaacgttctg gtggttgca ccggttgccg tgcgggtgcg	1440
ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtggatg agctgtgcgg cgacggtctg	1500
aaagcggttc tgaccgcgat cggatgaagc aacggtctgg gtggcccgt gccgccggtg	1560
ctgcacatgg gtagctgctg tgacaacagc cgtgcggtgg cgctggttgc ggcgctggcg	1620
aaccgtctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgcggc ggaagcgtg	1680
catgagaagg cgtggcgat tggatcctgg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt	1740
ggtgtgctgc cgccgatcac cggcagcctg ccggtgaccc aaatcctgac cagcagcgtt	1800
aaagatatta ccggtggcta cttcatcgtt gaactggacc cggagaccgc ggcggacaaa	1860
ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a	1911

<210> 19

<211> 1911

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ChCODH-2 F41A

<400> 19

atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg	60
aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt	120
gcgggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgcctgcaag gtccgtgccg tattaacccg	180
tttggcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgaccg cggaagtgat cgttgcgcgt	240
ggtctggacc gtagcattgc ggcgggtgcg gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg	300
gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt	360
accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag	420
gatattgcgc tggaagttgc gaaagcggcg ctggcggact tccatgagaa agataccccg	480
gttctgtggg tgaccaccgt tctgccgccg agccgtgtga aggttctgag cgcgcatggt	540
ctgatcccgg cgggtattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt	600
tgcgacgcgg atgcgcagaa cctgtctgtg ggtggcctgc gttgcagcct ggcggacctg	660
gcgggttgct acatgggcac cgacctggcg gatatcctgt ttggtacccc ggcgccggtg	720
gttacgaaa gcaacctggg cgtgtctgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt	780
cacaaccggg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg	840
cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaacgtg gttggtatit gctgcaccgg caacgaggtg	900
ctgatgcgtc acggtattcc ggcgtgcacc cacagcgtta gccaggaaat ggcgatgac	960
accggcgcg cggacgcgat gatcctggat tatcagtga ttcaaccgag cgtggcgacc	1020
attgcggagt gcaccgttac caccgttatt accaccatgg aaatgagcaa aatcacgggt	1080
gcgacccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcaagca aatcctgcgt	1140
ctggcgattg atacctttaa acgtcgtaag ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag	1200
accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgtgag caagctgaac	1260
gcgaacgac cgtgaaacc gctgattgac aacgtgttga acggtaacat ccgtggcgtg	1320
tgctgtttcg cgggttgcaa caacgttaag gtgccgcagg accaaaactt taccaccatt	1380
gcgcgtaagc tgctgaaaca gaacgttctg gtggttgca cgggttgagg tgcgggtgag	1440
ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtggatg agctgtgcgg cgacgtctg	1500
aaagcggttc tgaccgcgat cgggtgaagcg aacggtctgg gtggcccgt gccgccggtg	1560

ctgcacatgg gtagctgcgt tgacaacagc cgtgcggtgg cgctggttgc ggcgctggcg	1620
aaccgtctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgcggc ggaagcgatg	1680
catgagaagg cggtagcgat tggtagctgg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt	1740
ggtgtgctgc cgccgatcac cggcagcctg ccggtgacct aaatcctgac cagcagcgtt	1800
aaagatatta ccggtggcta cttcatcgtt gaactggacc cggagaccgc ggcgacaaaa	1860
ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a	1911
<210> 20	
<211> 1911	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ChCODH-2 R57E	
<400> 20	
atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg	60
aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt	120
ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgccgtcaag gtccgtgcga aattaacccg	180
tttggcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgaccg cggaagtgat cgttgcgct	240
ggtctggacc gtagcattgc ggcggtgctg gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg	300
gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcgcgca gctatatgat taaggaccgt	360
accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag	420
gatattgcgc tggaagttag gaaagcggcg ctggcggtact tccatgagaa agataccccg	480
gttctgtggg tgaccaccgt tctgccgcg agccgtgtga aggttctgag cgcgcatggt	540
ctgatcccg cggttattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt	600
tgcgacgcgg atgcgcagaa cctgctgctg ggtggcctgc gttgcagcct ggcgacactg	660
gcgggttctg acatgggac cgacctggcg gatattctgt ttggtacccc ggcgccggtg	720
gttacgaaa gcaacctggg cgtgctgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt	780
cacaacccgg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg	840
cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaactg gttggtattt gctgcaccgg caacgaggtg	900
ctgatcgctc acggtattcc ggcgtgcacc cacagcgtta gccaggaaat ggcatgatc	960
accggcgccg tggacgcgat gatcctggat tatcagtga ttcaaccgag cgtggcgacc	1020
attgcggagt gcaccgttac caccgttatt accacatgg aaatgagcaa aatcaccggt	1080
gcgacccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcaagca aatcctcgct	1140

ctggcgattg atacctttaa acgtcgttaag ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag	1200
accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgctgag caagctgaac	1260
gcgaacgata cgtcgaacc gctgattgac aacgtggtta acggtaacat cctggcgtg	1320
tgcctgttcg cgggttgcaa caacgttaag gtgccgcagg accaaaactt taccaccatt	1380
gcgcgtaagc tgctgaaaca gaacgttctg gtggttgca ccggttgagg tgcgggtgag	1440
ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtggatg agctgtgagg cgacggtctg	1500
aaagcggttc tgaccgcat cgggtgaagcg aacggtctgg gtggcccgct gccgccggtg	1560
ctgcacatgg gtagctgcgt tgacaacagc cgtgcggtgg cgtggttgc gccgctggcg	1620
aaccgtctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgaggc ggaagcgatg	1680
catgagaagg cgggtggcat tggtagctgg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt	1740
ggtgtgctgc cggcgatcac cggcagcctg ccggtgaccc aaatcctgac cagcagcgtt	1800
aaagatatta ccggtggcta cttcatcgtt gaactggacc cggagaccgc gccggacaaa	1860
ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgag ggtctgggtc tgccgtggtg a	1911
<210> 21	
<211> 1911	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ChCODH-2 R57S	
<400> 21	
atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg	60
aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt	120
ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgcttcaag gtccgtgctc tattaacccg	180
tttggcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgaccg cggaagtgat cgttgcgct	240
ggtctggacc gtagcattgc ggccgggtgag gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg	300
gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt	360
accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag	420
gatattgcgc tggaagtgc gaaagcggcg ctggcggact tccatgagaa agataccccc	480
gttctgtggg tgaccacgt tctgccgccg agccgtgtga aggttctgag cgcgcatggt	540
ctgatcccg cgggtattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt	600
tgcgacgagg atgcgcagaa cctgtctgtg ggtggcctgc gttgcagcct ggccgacctg	660
gcgggttgct acatgggcac cgacctggcg gatatcctgt ttggtacccc ggcccggtg	720

gttaccgaaa gcaacctggg cgtgctgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt 780
cacaaccgg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg 840
cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaacgtg gttggtatit gctgcaccgg caacgaggtg 900
ctgatgcgtc acggtattcc ggctgacacc cacagcgta gccaggaaat ggcatgatc 960
accggcgcgc tggacgcgat gatcctggat tatcagtga ttcaaccgag cgtggcgacc 1020

attgcggagt gcaccggtac caccgttatt accacatgg aaatgagcaa aatcaccggt 1080
gcgaccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acggaagca aatcctgcgt 1140
ctggcgattg atacctttaa acgtcgtaag ggtaaacgg tggagatccc gaacattaag 1200
accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgtgag caagctgaac 1260
gcgaacgatc cgctgaaacc gctgattgac aacgtggtta acgtaacat ccgtggcgtg 1320
tgctgttcg cgggttgcaa caacgttaag gtccgcagg accaaaactt taccaccatt 1380
gcgcgtaagc tgctgaaaca gaacgttctg gtggttcga ccggttgcgg tgcgggtgcg 1440

ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtggatg agctgtcgg cgacggtctg 1500
aaagcggttc tgaccgcgat cggatgaagcg aacgtctgg gtggcccgct gccgccggtg 1560
ctgcacatgg gtagctgcgt tgacaacagc cgtgcggtgg cgctggttg gccgctggcg 1620
aaccgtctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgcggc ggaagcgatg 1680
catgagaagg cggtagcgat tggtacctgg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt 1740
ggtgtgctgc cgccgatcac cggcagcctg ccggtgacct aaatcctgac cagcagcgtt 1800
aaagatatta ccggtggcta ctcatcgtt gaactggacc cggagaccgc ggcggacaaa 1860

ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a 1911

<210> 22
<211> 1911
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ChCODH-2 R57F
<400> 22

atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg 60
aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt 120
ttcgcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgctgcaag gtccgtgctt cattaaccg 180
tttggcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgaccg cggaagtgat cgttgcgcgt 240

ggtctggacc gtagcattgc ggcggtgcg gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg 300

gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt 360
 accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag 420
 gatattgcgc tggaagtgc gaaagcggcg ctggcggact tccatgagaa agataccccg 480
 gttctgtggg tgaccacgt tctgccgccg agccgtgtga aggttctgag cgcgcatggt 540
 ctgatcccg cggtattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt 600
 tgcgacggg atgcgcagaa cctgctgctg ggtggcctgc gttgcagcct ggcggaacctg 660

gcgggttgct acatgggcac cgacctggcg gatatcctgt ttggtacccc ggcgccggtg 720
 gttaccgaaa gcaacctggg cgtgctgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt 780
 cacaacccgg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg 840
 cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaacgtg gttggtatct gctgcaccgg caacgaggtg 900
 ctgatgcgtc acggtattcc ggctgcacc cacagcgtta gccaggaaat ggcatgatc 960
 accggcgcgc tggacgcgat gatcctggat tatcagtga ttcaaccgag cgtggcgacc 1020
 attgcggagt gcaccgtac caccgttatt accaccatgg aaatgagcaa aatcaccggt 1080

gcgacccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcgaagca aatcctgcgt 1140
 ctggcgattg atacctttaa acgtcgtgaa ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag 1200
 accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgctgag caagctgaac 1260
 gcgaacgac cgctgaaacc gctgattgac aacgtggtta acggtaacat ccgtggcgtg 1320
 tgcctgttcg cgggttgcaa caacgttaag gtgccgcagg accaaaactt taccaccatt 1380
 gcgcgtaagc tgctgaaaca gaacgttctg gtggttgcca ccggttgcgg tgcgggtgcg 1440
 ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtggatg agctgtgcgg cgacggtctg 1500

aaagcggttc tgaccgcgat cggtaagcg aacggtctgg gtggcccgt gccgccggtg 1560
 ctgcacatgg gtagctgcgt tgacaacagc cgtgcggtgg cgctggttgc ggcgctggcg 1620
 aaccgtctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgcggc ggaagcgatg 1680
 catgagaagg cggtggcgat tggtaacctg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt 1740
 ggtgtgctgc cgccgatcac cggcagcctg ccggtgaccc aaatcctgac cagcagcgtt 1800
 aaagatatta ccggtggcta cttcatcgtt gaactggacc cggagaccgc ggcggacaaa 1860
 ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a 1911

<210> 23

<211> 1911

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ChCODH-2 R57G

<400> 23

atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg	60
aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt	120
ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgcctgcaag gtccgtgcgg tattaacccg	180
tttggcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgaccg cggaagtgat cgttgcgcgt	240
ggtctggacc gtagcattgc ggcgggtgcg gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg	300
gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt	360
accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag	420
gatattgcgc tggaaattgc gaaagcggcg ctggcggact tccatgagaa agataccccg	480
gttctgtggg tgaccaccgt tctgcccgcg agccgtgtga aggttctgag cgcgcattgt	540
ctgatcccgg cgggtattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt	600
tgcgacgcgg atgcgcagaa cctgctgctg ggtggcctgc gttgcagcct ggcggacctg	660
gcgggttgc acatgggcac cgacctggcg gatatcctgt ttggtacccc ggcgccggtg	720
gttacgaaa gcaacctggg cgtgctgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt	780
cacaaccggt ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg	840
cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaacgtg gttggtatit gctgcaccgg caacgaggtg	900
ctgatgcgtc acggtattcc ggcgtgcacc cacagcgtta gccaggaaat ggcgatgac	960
accggcgcgc tggacgcgat gatcctggat tatcagtga ttcaaccgag cgtggcgacc	1020
attgcggagt gcaccgttac caccgttatt accacatgg aaatgagcaa aatcaccggt	1080
gcgacccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcaagca aatcctgcgt	1140
ctggcgattg atacctttaa acgtcgtaag ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag	1200
accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgctgag caagctgaac	1260
gcgaacgac cgtgaaacc gctgattgac aacgtgttga acggtaacat ccgtggcgtg	1320
tgcctgttcg cgggttgcaa caacgttaag gtgccgcagg accaaaactt taccaccatt	1380
gcgcgtaagc tgctgaaaca gaacgttctg gtggttgca cgggttcggg tgcgggtgcg	1440
ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtggatg agctgtcgg cgacggtctg	1500
aaagcggttc tgaccgcgat cggtaagcg aacggtctgg gtggcccgt gccgccggtg	1560
ctgcacatgg gtagctgctg tgacaacagc cgtgcggtgg cgctggttgc ggcgctggcg	1620
aacgtcttgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtgttgc cgagcgcggc ggaagcgatg	1680
catgagaagg cgttggcgat tggtagctgg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt	1740

ggtgtgctgc cgccgatcac cggcagcctg ccggtgaccc aaatcctgac cagcagcgtt 1800
 aaagatatta ccggtggcta cttcatcggt gaactggacc cggagaccgc ggcggacaaa 1860
 ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a 1911
 <210> 24
 <211> 1911
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ChCODH-2 R57Q
 <400> 24
 atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg 60
 aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt 120
 ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgcctgcaag gtccgtgcc aattaacccg 180
 tttggcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgaccg cggaagtgat cgttgcgcgt 240
 ggtctggacc gtagcattgc ggcgggtgcg gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg 300
 gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt 360

 accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag 420
 gatattgcgc tggaagtgc gaaagcggcg ctggcggaact tccatgagaa agataccccc 480
 gttctgtggg tgaccaccgt tctgccgccg agccgtgtga aggttctgag cgcgcatggt 540
 ctgatcccg cggttattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt 600
 tgcgacgagg atgcgcagaa cctgctgctg ggtggcctgc gttgcagcct ggccggacctg 660
 gcgggttctg acatgggcac cgacctggcg gatatcctgt ttggtacccc ggcgccgggtg 720
 gttaccgaaa gcaacctggg cgtgctgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt 780

 cacaaccggg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg 840
 cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaactg gttggtatct gctgcaccgg caacgaggtg 900
 ctgatgcgtc acggtattcc ggcgtgcacc cacagcgtta gccaggaaat ggcgatgatc 960
 accggcgcgc tggacgcgat gatcctggat tatcagtga ttcaaccgag cgtggcgacc 1020
 attgcggagt gcaccgttac caccgttatt accaccatgg aatgagcaa aatcaccggt 1080
 gcgacccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcaagca aatcctgcgt 1140
 ctggcgattg atacctttaa acgtcgtgaa ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag 1200

 accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgctgag caagctgaac 1260
 gcgaacgatc cgctgaaacc gctgattgac aacgtggtta acggtaacat ccgtggcgtg 1320

tgcctgttcg cgggttgcaa caacgttaag gtgccgcagg accaaaactt taccaccatt 1380
gcgcgtaagc tgctgaaaca gaacgttctg gtggttgcca ccggttgcgg tgcgggtgcg 1440
ctgatgcgtc acggttttat ggacccggcg aacgtggatg agctgtgcgg cgacggtctg 1500
aaagcggttc tgaccgcgat cgggtgaagcg aacggtctgg gtggcccgtc gccgccggtg 1560
ctgcacatgg gtagctgcgt tgacaacagc cgtgcggtgg cgctggttgc ggcgctggcg 1620

aaccgtctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgcggc ggaagcgatg 1680
catgagaagg cggtagcgat tggtagctgg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt 1740
ggtgtgctgc cccgatcac cggcagcctg ccggtgacct aaatcctgac cagcagcgtt 1800
aaagatatta ccggtggcta ctatcatggt gaactggacc cggagaccgc ggccggacaaa 1860
ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a 1911

<210> 25

<211> 1911

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ChCODH-2 N59L

<400> 25

atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg 60
aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacaggc cgatgaagcc gcagtgcggt 120
ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgccgtcaag gtccgtgccg tattcttccg 180
tttggcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgaccg cggaagtgat cgttgcgcgt 240
ggtctggacc gtagcattgc ggcgggtgcg gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg 300
gcgcacacc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt 360
accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag 420

gatattgcgc tggaagtgc gaaagcggcg ctggcggact tccatgagaa agataccccg 480
gttctgtggg tgaccaccgt tctgccgccg agccgtgtga aggttctgag gcgcgatggt 540
ctgatcccg cgggtattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt 600
tgcgacgcgg atgcgcagaa cctgtctgtg ggtggcctgc gttgcagcct ggcggacctg 660
gcgggttgc acatgggcac cgacctggcg gatattctgt ttggtacccc ggccgccggtg 720
gttaccgaaa gcaacctggg cgtgtgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt 780
cacaaccgg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg 840

cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaactg gttggtatgt gctgcaccgg caacgaggtg 900

ctgatgcgtc acggtattcc ggctgacacc cacagcgta gccaggaaat ggcatgatc 960
accggcgcgc tggacgcgat gatcctggat tatcagtca ttcaaccgag cgtggcgacc 1020
attgcggagt gcaccggtac caccgttatt accaccatgg aaatgagcaa aatcaccggt 1080
gcgacccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcaagca aatcctgcgt 1140
ctggcgattg atacctttaa acgtcgttaag ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag 1200
accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgctgag caagctgaac 1260

gcgaacgatc cgctgaaacc gctgattgac aacgtggta acgtaacat ccgtggcgtg 1320
tgctgttcg cgggttgcaa caacgttaag gtccgcagg accaaaactt taccaccatt 1380
gcgctgaagc tgctgaaaca gaacgttctg gtggttcga ccggttgcgg tcgggtgcg 1440
ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtggatg agctgtgcgg cgacggtctg 1500
aaagcggttc tgaccgcgat cggtaagcg aacggtctgg gtggcccgt gccgccggtg 1560
ctgcacatgg gtagctgctg tgacaacagc cgtgcggtgg cgctggttg gccgctggcg 1620
aacggtctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgcggc ggaagcgatg 1680

catgagaagg cggtagcgat tggtagctgg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt 1740
ggtgtgctgc cgccgatcac cggcagcctg ccggtgacct aaatcctgac cagcagcgtt 1800
aaagatatta ccggtggcta ctcatcgtt gaactggacc cggagaccgc ggcggacaaa 1860
ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a 1911

<210> 26
<211> 1911
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ChCODH-2 N59A
<400> 26

atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg 60

aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt 120
ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgctgcaag gtccgtgccg tattgctccg 180
tttggcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgacc cggaagtgat cgttgcgcgt 240
ggtctggacc gtagcattgc ggcgggtgcg gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg 300
gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt 360
accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag 420
gatattgcgc tggaagtgc gaaagcggcg ctggcggact tccatgagaa agataccccg 480

gttctgtggg tgaccaccgt tctgccgccg agccgtgtga aggttctgag cgcgcacgtt 540
ctgatcccg cgggtattga tcacgaaac gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt 600
tgcgacgcgg atgcgcagaa cctgctgctg ggtggcctgc gttgcagcct ggcggacctg 660
gcgggttgc acatgggcac cgacctggcg gatctctgt ttggtacccc ggcgccggtg 720
gttaccgaaa gcaacctggg cgtgctgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacgtt 780
cacaaccgg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg 840
cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaacgtg gttggtatct gctgcaccgg caacgaggtg 900

ctgatgcgtc acgttattcc ggcgtgcacc cacagcgtta gccaggaaat ggcgatgatc 960
accggcgccg tggacgcgat gatcctggat tatcagtga ttcaaccgag cgtggcgacc 1020
attgcggagt gcaccgttac caccgttatt accaccatgg aaatgagcaa aatcaccggt 1080
gcgacccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcaagca aatcctgcgt 1140
ctggcgattg atacctttaa acgtcgtgaag ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag 1200
accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgtgag caagctgaac 1260
gcgaacgatc cgtgaaacc gctgattgac aacgtggtta acgtaacat cctggcgctg 1320

tgcctgttcg cgggttgcaa caacgttaag gtccgcagg accaaaactt taccaccatt 1380
gcgcgtaagc tgcgaaaca gaacgttctg gtggttgca cgggttcgg tgcgggtgcg 1440
ctgatgcgtc acgtttttat ggaccggcg aacgttgatg agctgtgcgg cgacggtctg 1500
aaagcggttc tgaccgcgat cggatgaagc aacgtctgg gtggcccgt gccgccggtg 1560
ctgcacatgg gtagctgctg tgacaacagc cgtgcggtgg cgctggttgc ggcgctggcg 1620
aacgtctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgcgcc ggaagcgatg 1680
catgagaagg cgtggcgat tggtagctgg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt 1740

ggtgtgctgc cgccgatcac cggcagcctg ccggtgaccc aaatcctgac cagcagcgtt 1800
aaagatatta ccggtggcta cttcatcgtt gaactggacc cggagaccgc ggcggacaaa 1860
ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a 1911

<210> 27
<211> 1911
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ChCODH-2 N59F
<400> 27

atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg 60

aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt	120
ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgcctgcaag gtccgtgccg tatttttccg	180
tttggcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgaccg cggaagtgat cgttgcgcgt	240
ggtctggacc gtagcattgc ggcgggtgcg gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg	300
gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt	360
accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag	420
gatattgcgc tggaagtgc gaaagcggcg ctggcggact tccatgagaa agataccccg	480
gttctgtggg tgaccaccgt tctgccgcg agccgtgtga aggttctgag cgcgcattggt	540
ctgatcccgg cgggtattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt	600
tgcgacgcgg atgcgcagaa cctgctgtg ggtggcctgc gttgcagcct ggcggacctg	660
gcgggttctg acatgggcac gcacctggcg gatatcctgt ttggtacccc ggcgccggtg	720
gttacgaaa gcaacctggg cgtgtgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt	780
cacaacccgg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg	840
cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaactg gttggtatit gctgcaccgg caacgaggtg	900
ctgatgcgtc acggtattcc ggcgtgcacc cacagcgtta gccaggaaat ggcgatgatc	960
accggcgcgc tggacgcgat gatcctggat tatcagtga ttcaaccgag cgtggcgacc	1020
attgctggagt gcaccgttac caccgttatt accacatgg aaatgagcaa aatcacccgt	1080
gcgacccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcaagca aatcctgcgt	1140
ctggcgattg atacctttaa acgtcgtaag ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag	1200
accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgctgag caagctgaac	1260
gcgaacgac cgtgaaacc gctgattgac aacgtgtta acgtaacat ccgtggcgtg	1320
tgcctgttcg cgggttgcaa caacgttaag gtgccgcagg accaaaactt taccaccatt	1380
gcgcgtaagc tgctgaaaca gaacgttctg gtggttgca ccggttgccg tgcgggtgcg	1440
ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtggatg agctgtgcgg cgacggtctg	1500
aaagcggttc tgaccgcgat cggatgaagcg aacggtctgg gtggcccgt gccgccggtg	1560
ctgcacatgg gtagctgctg tgacaacagc cgtgcggtgg cgctggttgc ggcgctggcg	1620
aaccgtctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgcggc ggaagcgatg	1680
catgagaagg cgggtggcgt ttgtacctgg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt	1740
ggtgtgctgc cgccgatcac cggcagcctg ccggtgaccc aaatcctgac cagcagcgtt	1800

aaagatatta ccggtggcta cttcatcggt gaactggacc cggagaccgc ggcggacaaa	1860
ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a	1911
<210> 28	
<211> 1911	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ChCODH-2 N59K	
<400> 28	
atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg	60
aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt	120
ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgcctgcaag gtccgtgccg tattaagccg	180
tttggcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgaccg cggaagtgat cgttgcgcgt	240
ggtctggacc gtagcattgc ggcgggtgcg gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg	300
gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt	360
accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag	420
gatattgcgc tggaagtgc gaaagcggcg ctggcggact tccatgagaa agataccccg	480
gttctgtggg tgaccaccgt tctgccgccg agccgtgtga aggttctgag cgcgcattgt	540
ctgatcccgg cgggtattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt	600
tgcgacgcgg atgcgcagaa cctgctgctg ggtggcctgc gttgcagcct ggcggacctg	660
gcgggttgc acatgggcac cgacctggcg gatatcctgt ttggtacccc ggcgccggtg	720
gttaccgaaa gaaacctggc cgtgctgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt	780
cacaaccggt ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg	840
cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaacgtg gttggtatit gctgcaccgg caacgaggtg	900
ctgatgcgtc acggtattcc ggcgtgcacc cacagcgtta gccaggaaat ggcgatgatc	960
accggcgcgc tggacgcgat gatcctggat tatcagtga ttcaaccgag cgtggcgacc	1020
attgcggagt gcaccggtac caccgttatt accaccatgg aaatgagcaa aatcaccggt	1080
gcgacccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcaagca aatcctgcgt	1140
ctggcgattg atacctttaa acgtcgtaag ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag	1200
accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgctgag caagctgaac	1260
gcgaacgac cgtgaaac gctgattgac aacgtgttta acgtaacat cctggcgtg	1320
tgcctgttcg cgggttgcaa caacgttaag gtgccgcagg accaaaactt taccaccatt	1380

gcgcgtaagc tgctgaaaca gaacgttctg gtggttcga ccggttcgg tcgsggtgcg 1440

ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtgatg agctgtcgg cgacggtctg 1500

aaagcggttc tgaccgcgat cggatgaagc aacgtcttg gtggccgct gccgccggtg 1560

ctgcacatgg gtagctgcgt tgacaacagc cgtgcggtgg cgctggttgc ggcgctggcg 1620

aaccgtctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgcggc ggaagcgatg 1680

catgagaagg cggatggcat tggtacctgg gcggttacca tcggtctgcc gacccacatt 1740

ggtgtgctgc cgccgatcac cggcagcctg ccggtgacct aaatcctgac cagcagcgtt 1800

aaagatatta ccggtggcta cttcatcgtt gaactggacc cggagaccgc ggcggacaaa 1860

ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a 1911

<210> 29

<211> 1911

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ChCODH-2 N59D

<400> 29

atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg 60

aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt 120

ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgcctgcaag gtccgtgccg tattgatccg 180

tttggcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgaccg cggaagtgat cgttgcgcgt 240

ggtctggacc gtagcattgc ggcgggtgcg gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg 300

gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt 360

accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag 420

gatattgcgc tggaagtgc gaaagcggcg ctggcggact tccatgagaa agataccccg 480

gttctgtggg tgaccaccgt tctgccgccc agccgtgtga aggttctgag cgcgcatggt 540

ctgatcccgg cgggtattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt 600

tgcgacgagg atgcgcagaa cctgctgctg ggtggcctgc gttgcagcct ggcggacctg 660

gcgggttgc acatgggcac cgacctggcg gatatcctgt ttggtacccc ggcgccggtg 720

gttacgaaa gcaacctggg cgtgtgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt 780

cacaacccgg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg 840

cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaactg gttggtatit gctgcaccgg caacgaggtg 900

ctgatgcgtc acggtattcc ggcgtgcacc cacagcgtta gccaggaaat ggcgatgatc 960

accggcgcgcg tggacgcgat gatcctggat tatcagtga ttcaaccgag cgtggcgacc	1020
attgcggagt gcaccgggtac caccgttatt accaccatgg aaatgagcaa aatcaccggt	1080
gcgaccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcgaagca aatcctgcgt	1140
ctggcgattg atacctttaa acgtcgttaag ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag	1200
accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgctgag caagctgaac	1260
gcgaacgata cgtgaaacc gctgattgac aacgtggtta acggtaacat cgtggcggtg	1320
tgcctgttcg cgggttgcaa caacgttaag gtccgcagg accaaaactt taccaccatt	1380
gcgctaagc tgcgaaaca gaacgttctg gtggttcga ccggttcggtg tgcgggtgcg	1440
ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtggatg agctgtgcgg cgacggtctg	1500
aaagcggttc tgaccgcgat cggatgaagcg aacggtctgg gtggcccgt gccgccggtg	1560
ctgcacatgg gtagctgcgt tgacaacagc cgtgcggtgg cgtggttgc ggcgctggcg	1620
aaccgtctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgcggc ggaagcgatg	1680
catgagaagg cgtggcgat tggatcctgg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt	1740
ggtgtgctgc cccgatcac cggcagcctg ccggtgaccc aaatcctgac cagcagcgtt	1800
aaagatatta ccggtggcta cttcatcgtt gaactggacc cggagaccgc ggcggacaaa	1860
ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a	1911
<210> 30	
<211> 1911	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ChCODH-2 N59G	
<400> 30	
atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg	60
aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt	120
ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgcctgcaag gtccgtgccg tattggtccg	180
tttggcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgaccg cggaagtgat cgttgcgcgt	240
ggtctggacc gtagcattgc ggcgggtgcg gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg	300
gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt	360
accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag	420
gatattgcgc tggaagtgc gaaagcggcg ctggcgact tccatgagaa agataccccg	480
gttctgtggg tgaccaccgt tctgccgccg agccgtgtga aggttctgag cgcgcatggt	540

ctgatcccg cggtattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt 600
 tgcgacgcgg atgcgcagaa cctgctgctg ggtggcctgc gttgcagcct ggcggacctg 660
 gcgggttgct acatgggcac cgacctggcg gatatcctgt ttggtacccc ggcgccggtg 720

gttacgaaa gcaacctggg cgtgctgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt 780
 cacaaccggg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg 840
 cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaacgtg gttggtatit gctgcaccgg caacgaggtg 900
 ctgatgcgtc acggtattcc ggcgtgcacc cacagcgtta gccaggaaat ggcgatgac 960
 accggcgcgc tggacgcgat gatcctggat tatcagtca ttcaaccgag cgtggcgacc 1020
 attgcggagt gcaccggtac caccgttatt accacatgg aaatgagcaa aatcacgggt 1080
 gcgacccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcaagca aatcctgcgt 1140

ctggcgattg atacctttaa acgtcgtaag ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag 1200
 accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgctgag caagctgaac 1260
 gcgaacgatc cgtgaaacc gctgattgac aacgtggtta acgtaacat ccgtggcgtg 1320
 tgcctgttcg cgggttgcaa caacgttaag gtgccgcagg accaaaactt taccaccatt 1380
 gcgcgtaagc tgctgaaaca gaacgttctg gtggttgca cgggttgcgg tgcgggtgcg 1440
 ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtggatg agctgtgcgg cgacggtctg 1500
 aaagcggttc tgaccgcgat cggatgaagcg aacggtctgg gtggcccgt gccgccggtg 1560

ctgcacatgg gtagctgcgt tgacaacagc cgtgcggtgg cgctggttgc ggcgctggcg 1620
 aaccgtctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgcggc ggaagcgatg 1680
 catgagaagg cgggtggcgt tggatcctgg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt 1740
 ggtgtgctgc cgccgatcac gcgcagcctg ccggtgacct aaatcctgac cagcagcgtt 1800
 aaagatatta ccggtggtta ctcatcgtt gaactggacc cggagaccgc ggcggacaaa 1860
 ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a 1911

<210> 31
 <211> 1911
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> ChCODH-2 P65K
 <400> 31

atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg 60
 aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt 120

ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgcctgcaag gtccgtgccg tattaacccg	180
tttggcgatg agaaaaaagt gggcatttgc ggtgcgaccg cggaagtgat cgttgcgcgt	240
ggtctggacc gtagcattgc ggccgggtgcg gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg	300
gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt	360
accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag	420
gatattgcgc tggaagtgc gaaagcggcg ctggcggact tccatgagaa agataccccg	480
gttctgtggg tgaccaccgt tctgccgccg agccgtgtga aggttctgag cgcgcatggt	540
ctgatcccg cggtattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt	600
tgcgacgcgg atgcgcagaa cctgtctgtg ggtggcctgc gttgcagcct ggccggacctg	660
gcgggttgc acatgggcac cgacctggcg gatatcctgt ttggtacccc ggcccggtg	720
gttacgaaa gcaacctggg cgtgctgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt	780
cacaacccgg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg	840
cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaacgtg gttggtatct gctgcaccgg caacgaggtg	900
ctgatgcgtc acggtattcc ggctgtcacc cacagcgtta gccaggaaat ggcatgatc	960
accggcgcg tgacgcgat gatcctggat tatcagtca ttcaaccgag cgtggcgacc	1020
attgcggagt gcaccgtac caccgttatt accaccatgg aatgagcaa aatcaccgt	1080
gcgacccatg tgaactttg ggaggaagcg gcggttga acgcgaagca aatcctgcgt	1140
ctggcgattg atacctttaa acgtcgtaag ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag	1200
accaaagtgg ttccgggctt cagcaccgaa gcgacatta acgcgtgag caagctgaac	1260
gcgaacgatc cgctgaaacc gctgattgac aacgtggtta acggtaacat ccgtggcgtg	1320
tgcctgttcg ccgggttcaa caacgttaag gtccgcagg accaaaactt taccaccatt	1380
gcgctgaagc tgcgtgaaac gaacgttctg gtggttgcga ccggttgcgg tgcgggtgcg	1440
ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtggatg agctgtgcgg cgacggtctg	1500
aaagcggttc tgaccgcgat cggatgaagc aacgttctgg gtggcccgt gccgccggtg	1560
ctgcacatgg gtagctgcgt tgacaacagc cgtgcggtgg cgctggttgc ggcgctggcg	1620
aaccgtctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgcggc ggaagcgatg	1680
catgagaagg cgttggcgat tggtagctgg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt	1740
ggtgtgctgc cgccgatcac cggcagcctg ccggtgaccc aaatcctgac cagcagcgtt	1800
aaagatatta ccggtggcta cttcatcgtt gaactggacc cggagaccgc ggccgacaaa	1860
ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a	1911

<210> 32

<211> 1911
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ChCODH-2 P65D
 <400> 32

atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg	60
aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt	120
ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgcctgcaag gtccgtgccg tattaacccg	180
tttggcgatg aggataaagt gggcatttgc ggtgcgaccg cggaagtgat cgttgcgcgt	240
ggtctggacc gtagcattgc ggcgggtgcg gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg	300
gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt	360
accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag	420
gatattgcgc tggaagttgc gaaagcggcg ctggcggact tccatgagaa agataccccc	480
gttctgtggg tgaccaccgt tctgccgccg agccgtgtga aggttctgag cgcgcatggt	540
ctgatcccgg cgggtattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt	600
tgcgacgcgg atgcgcagaa cctgtctgtg ggtggcctgc gttgcagcct ggcggacctg	660
gcgggttgc acatgggcac cgacctggcg gatatcctgt ttggtacccc ggcgccggtg	720
gttaccgaaa gcaacctggg cgtgtctgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt	780
cacaaccggg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg	840
cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaacgtg gttggtatit gctgcaccgg caacgaggtg	900
ctgatgcgtc acggtattcc ggcgtgcacc cacagcgtta gccaggaaat ggcgatgac	960
accggcgcgc tggacgcgat gatcctggat tatcagtga ttcaaccgag cgtggcgacc	1020
attgcggagt gcaccgttac caccgttatt accaccatgg aaatgagcaa aatcacgggt	1080
gcgacccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcaagca aatcctgcgt	1140
ctggcgattg atacctttaa acgtcgtaag ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag	1200
accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgtgag caagctgaac	1260
gcgaacgata cgtgaaacc gctgattgac aacgtggtta acggtaacat ccgtggcgtg	1320
tgctgtttcg cgggttgcaa caacgttaag gtccgcagg accaaaactt taccaccatt	1380
gcgcgtaagc tgctgaaaca gaacgttctg gtggttgca cgggttgagg tgcgggtgag	1440
ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtggatg agctgtgcgg cgacggtctg	1500
aaagcggttc tgaccgcgat cgggtgaagcg aacggtctgg gtggcccgt gccgcccgtg	1560

ctgcacatgg gtagctgcgt tgacaacagc cgtgcggtgg cgctggttgc ggcgctggcg 1620
aaccgtctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgcggc ggaagcgatg 1680

catgagaagg cggtagcgat tggtagctgg gcggttacca tcggtctgcc gacccacatt 1740
ggtgtgctgc cgccgatcac cggcagcctg ccggtgacct aaatcctgac cagcagcgtt 1800
aaagatatta ccggtggcta cttcatcgtt gaactggacc cggagaccgc ggcggacaaa 1860
ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a 1911

<210> 33
<211> 1911
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ChCODH-2 R57E:N59G
<400> 33

atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg 60

aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt 120
ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgcctgcaag gtccgtgcga gatttggtccg 180
tttggcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgaccg cggaagtgat cgttgcgcgt 240
ggtctggacc gtagcattgc ggcgggtgcg gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg 300
gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt 360
accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag 420
gatattgcgc tggaagttgc gaaagcggcg ctggcggact tccatgagaa agataccccg 480

gttctgtggg tgaccaccgt tctgccgccg agccgtgtga aggttctgag cgcgcatggt 540
ctgatcccg cgggtattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt 600
tgcgacgcgg atgcgcagaa cctgctgctg ggtggcctgc gttgcagcct ggcggacctg 660
gcgggttctg acatgggac cgaactggcg gatatactgt ttggtacccc ggcgccggtg 720
gttacgaaa gcaacctggg cgtgctgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt 780
cacaacccgg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg 840
cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaactg gttggtattt gctgcaccgg caacgaggtg 900

ctgatgcgtc acggtattcc ggcgtgcacc cacagcgtta gccaggaaat ggcgatgatc 960
accggcgcgc tggacgcgat gatcctggat tatcagtga ttcaaccgag cgtggcgacc 1020
attgcggagt gcaccgttac caccgttatt accacatgg aaatgagcaa aatcaccggt 1080
gcgacccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcaagca aatcctgcgt 1140

ctggcgattg ataccttta acgtcgttaag ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag	1200
accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgtgag caagctgaac	1260
gcgaacgac cgtgaaacc gctgattgac aacgtggtta acggtaacat cctggcgtg	1320
tgctgttcg cgggttgcaa caacgttaag gtcccgagg accaaaactt taccaccatt	1380
gcgctaagc tgctgaaaca gaacgttctg gtggttcga ccggttcgg tcgggtgctg	1440
ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtggatg agctgtcgg cgacgtctg	1500
aaagcgttc tgaccgcat cggtaagcg aacgtcttg gtggccgct gccgccgtg	1560
ctgcacatgg gtagctgctg tgacaacagc cgtgcgttg cgctggttc gccgctggcg	1620
aaccgtctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgccg ggaagcgatg	1680
catgagaagg cgtggcgat tggtaacctg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt	1740
ggtgtgctgc cgccgatcac cggcagcctg ccggtgaccc aaatcctgac cagcagcgtt	1800
aaagatatta ccggtggcta ctcatcgtt gaactggacc cggagaccgc gccggacaaa	1860
ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a	1911
<210> 34	
<211> 1911	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ChCODH-2 R57G:N59G	
<400> 34	
atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg	60
aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt	120
ttcggcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgctgcaag gtccgtcgg tattggtccg	180
tttgcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgacc cggaagtgat cgttcgcgt	240
ggtctggacc gtagcattgc ggcggtgctg gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg	300
gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt	360
accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag	420
gatattgcgc tggaagtgc gaaagcggcg ctggcgact tccatgagaa agatacccg	480
gttctgtggg tgaccacgt tctgccgccg agccgtgtga aggttctgag cgcgcatggt	540
ctgatcccg cgggtattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt	600
tgcgacgagg atgcgcagaa cctgtctgtg ggtggcctgc gttgcagcct ggccgacctg	660
gcgggttgct acatgggcac cgacctggcg gatatcctgt ttgtlaccgc gccgccggtg	720

gttacgaaa gcaacctggg cgtgctgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt 780
cacaaccgg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg 840
cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaacgtg gttggtatit gctgcaccgg caacgaggtg 900
ctgatgcgtc acggtattcc ggctgacacc cacagcgta gccaggaaat ggcatgatc 960

accggcgcgc tggacgcgat gatcctggat tatcagtga ttcaaccgag cgtggcgacc 1020
attgaggagt gcaccggta caccgttatt accacatgg aatgagcaa aatcaccggt 1080
gcgaccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcaagca aatcctgcgt 1140
ctggcgattg ataccttta acgtcgtaag ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag 1200
accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgtgag caagctgaac 1260
gcgaacgatc cgctgaaacc gctgattgac aacgtggtta acgtaacat ccgtggcgtg 1320
tgctgttcg cgggttgcaa caacgttaag gtccgcagg accaaaactt taccaccatt 1380

gcgcgtaagc tgctgaaaca gaacgttctg gtggttgca ccggttgcgg tgcgggtgcg 1440
ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtggatg agctgtgcgg cgacggtctg 1500
aaagcggttc tgaccgcgat cgggtgaagcg aacggtctgg gtggcccgt gccgccggtg 1560
ctgcacatgg gtagctgcgt tgacaacagc cgtgcggtgg cgctggttgc ggctgtggcg 1620
aacgtctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgcggc ggaagcgatg 1680
catgagaagg cgggtggcat tggtagctgg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt 1740
ggtgtgctgc cgccgatcac cggcagcctg ccggtgacct aaatcctgac cagcagcgtt 1800

aaagatatta ccggtggcta ctcatcgtt gaactggacc cggagaccgc ggcgacaaa 1860
ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a 1911

<210> 35
<211> 1911
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ChCODH-2 R57G:N59L
<400> 35

atggcgaaac aaaatctgaa gagcaccgac cgtgcggttc aacaaatgct ggataaagcg 60
aagcgtgagg gtattcaaac cgtgtgggat cgttacgagg cgatgaagcc gcagtgcggt 120
ttcgcgaaa ccggtctgtg ctgccgtcac tgctgcaag gtccgtgcgg tattcttccg 180

tttggcgatg agccgaaagt gggcatttgc ggtgcgacc cggaagtgat cgttgcgct 240
ggtctggacc gtagcattgc ggccggtgcg gcgggtcata gcggtcatgc gaagcacctg 300

gcgcacaccc tgaagaaagc ggtgcagggc aaagcggcga gctatatgat taaggaccgt	360
accaaactgc acagcatcgc gaagcgtctg ggtattccga ccgaaggcca aaaagacgag	420
gatatcgcgc tggaagtgc gaaagcggcg ctggcggact tccatgagaa agataccccg	480
gttctgtggg tgaccaccgt tctgccgccg agccgtgtga aggttctgag cgcgcatggt	540
ctgatcccgg cgggtattga tcacgaaatc gcggagatta tgcaccgtac cagcatgggt	600
tgcgacgagg atgcgcagaa cctgctgctg ggtggcctgc gttgcagcct ggcggacctg	660
gcgggttgct acatgggcac cgacctggcg gatatcctgt ttggtacccc ggcgccgggtg	720
gttacgaaa gcaacctggg cgtgctgaag gcggatgcgg tgaacgttgc ggtgcacggt	780
cacaacccgg ttctgagcga catcattgtt agcgtgagca aagagatgga aaacgaggcg	840
cgtgcggcgg gtgcgaccgg tatcaacgtg gttggtatct gctgcaccgg caacgaggtg	900
ctgatgcgtc acggtattcc ggcgtgcacc cacagcgtta gccaggaaat ggcgatgatc	960
accggcgcgc tggacgcgat gatcctggat tatcagtga ttcaaccgag cgtggcgacc	1020
attgcggagt gcaccgttac caccgttatt accacatgg aaatgagcaa aatcaccggt	1080
gcgacccatg tgaactttgc ggaggaagcg gcggttgaga acgcgaagca aatcctgcgt	1140
ctggcgattg atacctttaa acgtcgtgaa ggtaaaccgg tggagatccc gaacattaag	1200
accaaagtgg ttgcgggctt cagcaccgaa gcgatcatta acgcgctgag caagctgaac	1260
gcgaacgac cgtgaaacc gctgattgac aacgtggtta acggtaacat ccgtggcgtg	1320
tgcctgttcg cgggttgcaa caacgttaag gtgccgcagg accaaaactt taccaccatt	1380
gcgcgtaagc tgctgaaaca gaacgttctg gtggttgcca ccggttgcgg tgcgggtgcg	1440
ctgatgcgtc acggttttat ggaccggcg aacgtggatg agctgtgcgg cgacggtctg	1500
aaagcggttc tgaccgcgat cggatgaagcg aacggtctgg gtggcccgt gccgccgggtg	1560
ctgcacatgg gtagctgcgt tgacaacagc cgtgcggtgg cgctggttgc ggcgctggcg	1620
aaccgtctgg gcgttgacct ggatcgtctg ccggtggttg cgagcgcggc ggaagcgatg	1680
catgagaagg cgggtggcgat tggtagctgg gcggttacca tcggtctgcc gaccacatt	1740
ggtgtgctgc cgccgatcac cggcagcctg ccggtgaccc aaatcctgac cagcagcgtt	1800
aaagatatta ccggtggcta cttcatcgtt gaactggacc cggagaccgc ggcggacaaa	1860
ctgctggcgg cgatcaatga gcgtcgtgcg ggtctgggtc tgccgtggtg a	1911