羰基还原酶酶库的构建及其在手性醇制备中的应用

汤佳伟，陈 浩，张露文，张 蕊，吴海燕，奕 栋，张福利，陈少欣*
（中国医药工业研究总院上海医药工业研究院，创新药物与制药工艺国家重点实验室，上海 201203）

摘要：羰基还原酶（CRED）是手性药物合成中的重要工具酶，已在工业生产中广泛应用。该研究利用多种基因挖掘策略获得了96个不同来源的CRED基因，于大肠埃希菌中克隆、表达，从而构建了CRED酶库1.0，并利用8种不同结构化合物考察了酶库的催化活性。结果表明，不同的酶对不同结构底物的催化活性有显著差别；并且，酶库中包含多个具有高催化活性的CRED，如K21、K42、K38和K73等，可分别高效催化还原乙酰乙酸乙酯、4-氯代乙酰乙酸乙酯、苯乙酮和苯甲酰乙酸乙酯。随后，采用K42和K87高效催化制备了光学手性醇（*S*）-4-氯-3-羟基丁酸酯（*ee*>99%），采用K94催化合成（*R*）-4-氯-3-羟基丁酸酯（*ee*>99%），时空收率高达800 g·(L·d)$^{-1}$。该研究所构建的CRED酶库1.0为手性药物的工业合成提供了新的选择。

关键词：羰基还原酶；酶库；重组表达；催化活性；手性醇
中图分类号：R915 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2023)09-1337-08
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.09.009

Construction of Carbonyl Reductase Enzyme Library and Its Application in Preparation of Chiral Alcohol

TANG Jiawei, CHEN Hao, ZHANG Luwen, ZHANG Rui, WU Haiyan, YI Dong, ZHANG Fuli, CHEN Shaoxin*
(*State Key Lab. of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Carbonyl reductases (CREDs) are valuable tools in the synthesis of chiral drugs. In this study, 96 CREDs from different sources were obtained by gene mining strategy, then cloned and expressed in *Escherichia coli* to construct CRED library 1.0. The catalytic performance of the enzyme library for eight substrates with different structures was investigated. The results showed that the catalytic performance of CREDs on various substrates with distinct structure was significantly different. Several enzymes with high catalytic activity were screened out from the enzyme library, such as K21, K42, K38 and K73, which can efficiently catalyze ethyl acetoacetate, 4-chloroacetoacetate ethyl ester, acetophenone and ethyl benzoylacetate, respectively. Later, the process development for the efficient preparation of optically chiral alcohol (*S*)-4-chloro-3-hydroxybutyrate (*ee*>99%) by carbonyl reductase K42 and K87, the synthesis of (*R*)-4-chloro-3-hydroxybutyrate (*ee*>99%) by K94 were successfully realized with a space-time yield of 800 g·(L·d)$^{-1}$. The carbonyl reductase library 1.0 provided a new tool box for industrial synthesis of chiral drugs.

Key Words: carbonyl reductase; enzyme library; recombinant expression; catalytic activity; chiral alcohol

辅酶还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（磷酸）[NAD(P)H]依赖的羰基还原酶（carbonyl reductase，CRED），又名醇脱氢酶（alcohol dehydrogenase，ADH）或酮还原酶（ketoredutase，KRED）是生物催化不对称还原中一类重要的氧化还原酶。CRED

收稿日期：2023-02-26
基金项目：科技部国家重点研发计划“绿色生物制造”项目(2021YFC2102100)、上海市浦江人才计划项目(21PJ1423200)
作者简介：汤佳伟(1993—)，男，博士，从事生物催化研究。
通信作者：陈少欣(1972—)，男，研究员，博士生导师，从事微生物药物的研究与开发。
E-mail：sxzlb@263.net

和葡萄糖脱氢酶、甲酸脱氢酶或醇脱氢酶协同作用，可实现 NAD(P)H 的循环，且最终立体或区域选择性地催化醛或酮底物转化为相应的手性醇（图 1）。近些年，CRED 已成功应用于多种重磅手性药物的合成中。例如，治疗重度抑郁症的度洛西汀、治疗高胆固醇血症的阿托伐他汀钙、治疗艾滋病的阿扎那韦和治疗血栓中风的替格瑞洛等[1—4]。随着基因组测序技术的发展，越来越多的 CRED 序列被识别和注释[5—6]。例如，SHAO 等[7]从短稳杆菌（*Empedobacter brevis* ZJUY-1401）中获得了 EbSDR8 CRED 突变体，可用于催化合成达泊西汀的关键中间体（*R*）-3- 氯 -1- 苯基 -1- 丙醇，底物浓度达 170 g/L，转化率达 95.5%，*ee* 值大于 99%。EbSDR8 CRED 打破了此前该底物无高效酶可用的困局，为实现（*R*）-3- 氯 -1- 苯基 -1- 丙醇的酶法绿色生产工艺奠定了基础。尽管各种来源的 CRED 不断出现，一部分 CRED 也实现了工业化应用，但目前能高效催化合成具有复杂结构手性醇的 CRED 还较少，因此，需要筛选更多新的、能够接受各种复杂底物的 CRED。

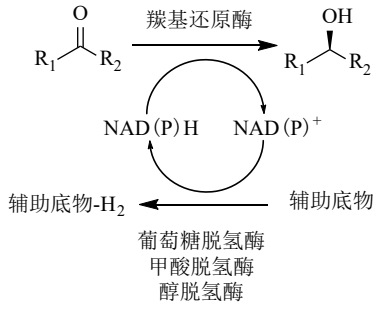


图 1　潜手性酮的不对称还原

Fig.1　Asymmetric Reduction of Enantiomeric Ketones

酶的开发时间和成本是影响酶催化工艺开发的关键因素。在 CRED 合成有价值的手性醇的工业化应用过程中，一般先以 CRED 酶库的筛选作为切入点筛选得到作为候选关键酶的 CRED，进行理性设计，以在较短时间内实现 CRED 在手性醇合成新工艺中的应用。而候选 CRED 的快速获得通常取决于 CRED 酶库的多样性和实用性。因此，本研究基于微生物基因组挖掘等手段，克隆不同来源、不同功能的 CRED 基因，构建了一个具有多样性的 CRED 酶库，并使用多种酮底物对该酶库进行初步测试，探究其在多种手性醇中的应用潜力。

1　药品与仪器

SE250 型蛋白电泳仪（美国 Hoefer 公司）；Synergy HTX 型酶标仪（美国伯腾仪器有限公司）；LC1260 型高效液相色谱仪（美国安捷伦科技公司）。

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase［宝日医生物技术（北京）有限公司］；常用的限制性内切酶购于宝生物工程（大连）有限公司；其他试剂均为分析纯试剂，购于国药集团化学试剂有限公司；酮底物购于默沃智造（上海）生物技术有限公司。

用于基因重组表达的 *Escherichia coli* BL21(DE3) 由本实验室保存。

2　方法与结果

2.1　培养基配制

平面培养基：胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、NaCl 10 g、琼脂粉 20 g，溶于去离子水 1 L 中，用 6 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 7.0。

LB 培养基：胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、NaCl 10 g，溶于去离子水 1 L 中，用 6 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 7.0。

发酵培养基：大豆蛋白胨 12 g、酵母提取物 24 g、NaCl 3 g、甘油 5 g、三水磷酸氢二钾 2 g、七水硫酸镁 0.5 g，溶于去离子水 1 L 中，用 6 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 7.3。

以上培养基均于 121 ℃灭菌 30 min 后使用。

2.2　CRED 基因克隆

以已报道的、活性较高的酶如 LSADH（AB213459）、LK（WP_054768785.1）、ADHA（WP_043801412.1）等为模板，通过 NCBI 数据库比对分析，获得 96 种不同来源的 CRED（来源与相对分子质量表保存于编辑部）的基因序列。委托南京金斯瑞生物科技公司，基于 *E. coli* 的密码子偏好性，对得到的 CRED 基因进行密码子优化和基因全合成，并采用 *Nde* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ进行双酶切，连接到 pET-28a 载体中，构建对应的表达质粒，并转化

至 *E. coli* BL21（DE3），获得重组工程菌，提取质粒 DNA 进行测序分析，均验证为目标序列。

2.3 96 个 CRED 重组菌的发酵培养

取上述构建的 96 个重组工程菌甘油菌各 1 μL，分别接种至装有种子培养基（含 50 μg/mL 卡那霉素）400 μL 的 96 孔板中，于 37 ℃培养箱中振荡（800 r/min）培养 12 ～ 16 h，得种子液。再分别取种子液 10 μL，转接至装有发酵培养基（含 50 μg/mL 卡那霉素）400 μL 的 96 孔板中，于 37 ℃培养箱中振荡（1 000 r/min）培养 3 h，得发酵液。当 OD_{600} 值 >1，向发酵液中加入异丙基 -β-D- 硫代半乳糖苷（IPTG，终浓度 0.5 mmol/L），于 28 ℃、1 000 r/min 条件下继续诱导培养 20 h。4 ℃离心（3 000×*g*）30 min，收集重组工程菌的菌体，并保存于 －20℃冰箱，备用。

采用 SDS-PAGE 法确认以上重组工程菌的表达情况（图 2），96 个重组蛋白的相对分子质量与预期相符，表明这 96 个重组工程菌已成功构建，而且能正常表达相应的 CRED。将 96 个 CRED 列入实验室的 CRED 酶库（KRED library 1.0）中。

2.4 粗酶液制备

用裂解缓冲液（100 mmol/L 磷酸氢二钾 - 磷酸二氢钾缓冲液，含溶菌酶 2 000 u，pH 7.0）400 μL 悬浮“**2.3**”项下的 96 个重组工程菌菌体，置振荡培养箱中，于 30 ℃、1 000 r/min 条件下裂解 1 h。4 ℃离心（3 000×*g*）30 min，收集上清液，得 CRED 粗酶液。使用 BCA 法测定酶粗液中总蛋白浓度。根据后续试验需求，用磷酸氢二钾 - 磷酸二氢钾缓冲液（100 mmol/L，pH 7.0）稀释粗酶液，并转移至新的 96 孔板中，于 4 ℃放置备用。

2.5 CREDs 催化 8 种酮基底物的催化效率

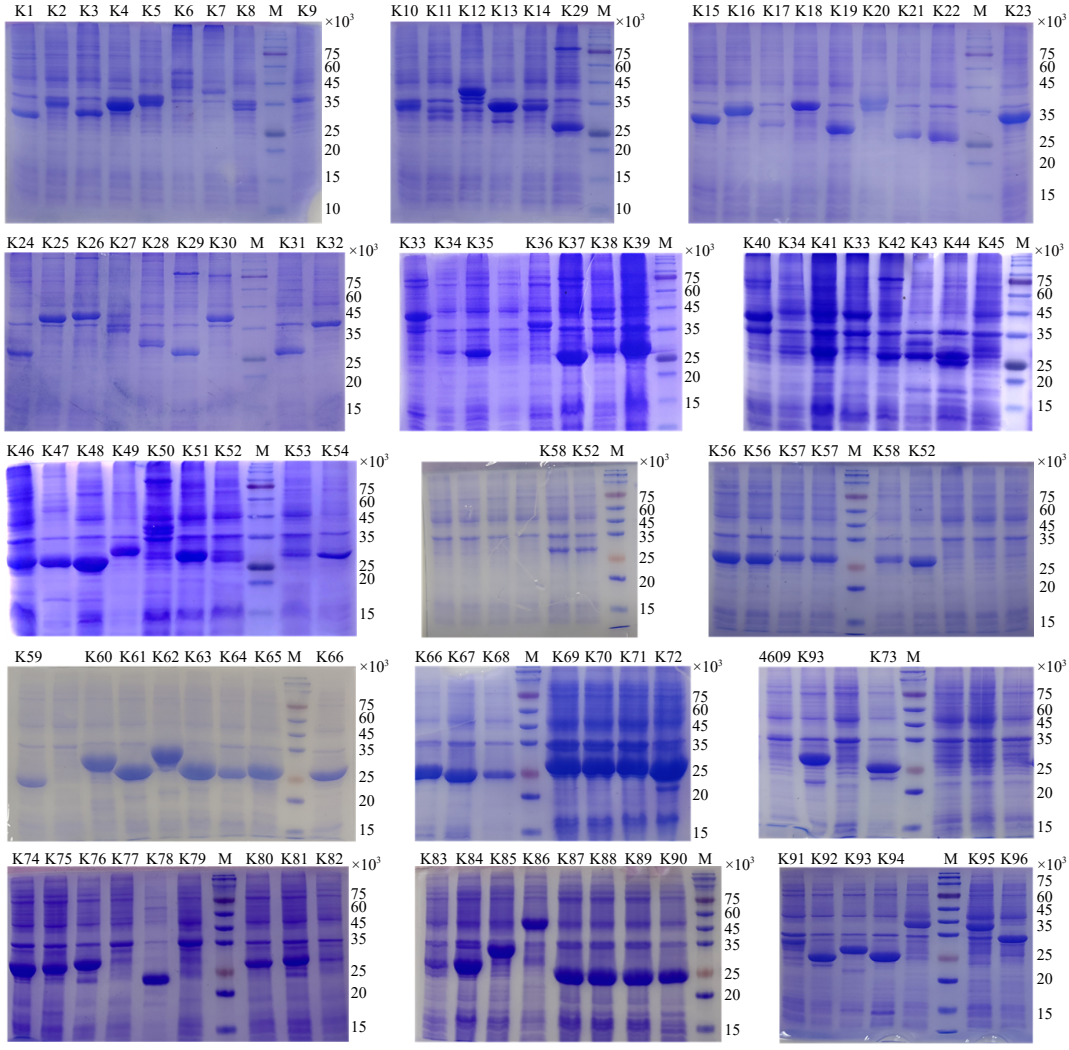
选择乙酰乙酸乙酯（**1**）、4- 氯乙酰乙酸乙酯（**2**）、4- 氯二苯甲酮（**3**）、苯乙酮（**4**）、2-（叔丁氧羰酰氨基）-3-[（4- 甲砜基）- 苯基]-3- 氧代丙酸甲酯酮（**5**）、4- 硝基 - 苯甲酰乙酸乙酯（**6**）、3-（4- 氯苯基）-3- 氧代 - 丙酸乙酯（**7**）和苯甲酰乙酸乙酯（**8**）作为模式底物，表征 96 个 CRED 的催化性质。采用分光光度法，用酶标仪（激发波长为 340 nm，以 1 min 内 NAD(P)H 的吸光值变化 [8] 为指标）测定 CRED 对上述 8 个底物的催化活性。1 个单位的酶活（u）定义为，25 ℃，每 1 min 消耗 1 μmoL NAD(P)H 所需的酶量。

反应体系：0.5 ～ 5 g/L 底物，0.5 g/L NAD(P)H，10%（体积分数）DMSO，磷酸氢二钾 - 磷酸二氢钾缓冲液（100 mmol/L，pH 7.0），适量的 CRED 粗酶液。

对上述 8 种酮底物的还原反应进行了初筛，结果以热图形式展示（图 3），绿色颜色越深，代表 CRED 催化该底物的活性越高。对于小体积底物 **1**（0.149 nm^3）和 **2**（0.182 nm^3），KRED library 1.0 中大多数 CRED 都表现出较好的催化活性。其中，K42 对 **2** 底物的催化活性较高（4.1 u/mL），是来源于白念珠菌（*Candida albicans*）的 CaCR 的 10 倍 [9—11]。相对于底物 **1** 和 **2**，KRED library 1.0 中的大部分酶在催化芳香酮底物 **4**（0.137 nm^3）和 **8**（0.204 nm^3）时活性较低。在初筛条件下，K38 催化 **4** 底物的活性较高，活性达 1.2 u/mL；K73 催化 **8** 底物的活性较高，活性达 1.4 u/mL。当羰基两侧取代基继续增大时，酶库中大部分酶的活性呈现显著下降趋势。其中，催化底物 **6** 活性较高的酶是 K29（0.6 u/mL）；催化 **7** 底物活性较高的酶是 K31（0.5 u/mL）；催化 **3** 活性较高的酶是 K70（0.2 u/mL）；催化 **5** 底物活性较高的酶是来源于微小杆菌（*Exiguobacterium* sp. F42）的 K73（0.4 u/mL）。因此，当羰基两侧的取代基空间位阻相对较大时，不利于酶识的别与结合。

2.6 CRED 酶库的生物学信息分析

本研究首先使用 MEGA 11 软件对 KRED library 1.0 中 CRED 氨基酸序列进行比对，构建进化树，然后通过 ChiPlot 工具进行热图添加，结果如图 4 所示。进化树的聚类分析结果显示，可将 KRED library 1.0 中 96 个 CRED 大致分为以下 3 类：醛酮还原酶（AKR）、中链脱氢酶（MDR）和短链脱氢酶（SDR）。在 K4、K5、K8、K9、K10、K11、K32 和 K79 等 15 个 AKR 序列中，有保守的催化位点 Tyr、Lys、His 和 Asp；MDR，如 K20、K33、



M—蛋白标准品。

图 2　重组工程菌表达的 CREDs 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2　SDS-PAGE Analysis of CREDs Expressed in *E.coli* BL21 (DE3)

K36、K40 和 K95 的序列中，有保守的催化位点 Cys 和 His；在 K1、K2、K3 和 K94 等 SDR 序列中，有保守的催化位点 Asn、Ser、Tyr 和 Lys 以及保守的辅酶结合序列 GXXXGX。SDR 中 K17、K26、K27、K30、K50 和 K96 属于拓展型 SDR（AR SDR），其序列长度约为 350 个氨基酸；其余的 SDR 属于经典型 SDR，其序列长度约为 250 个氨基酸。如，来源于开菲尔乳杆菌（*Lactobacillus kefir*）的 K39 和 K69 序列一致性达 98.4%，但是 K39 和 K69 对不同底物的催化活性存在明显差异。K69 在催化 **2** 的催化活性是 K39 的 5 倍；而 K69 在催化 **1** 的活性却低于 K39。因此，CRED 催化的底物类型及活性与酶序列一致性并不存在高度相关性，可能更多取决于其序列形成的空间结构，尤其是底物和辅酶的结合口袋结构。

为进一步验证上述推测，本研究重点考察了 K39 和 K69 底物结合口袋的差异对酶活的影响。首先以 K69 为模板，对序列一致性高达 98.4%的 K39 进行同源建模。K69 和 K39 的结构分析结果显示，K69 和 K39 的底物结合口袋存在较大差异。与 K69 相比，K39 底物结合口袋发生了 A94T、L199H 和 A202L 突变。其中，A94 位于大口袋（图 5 虚线

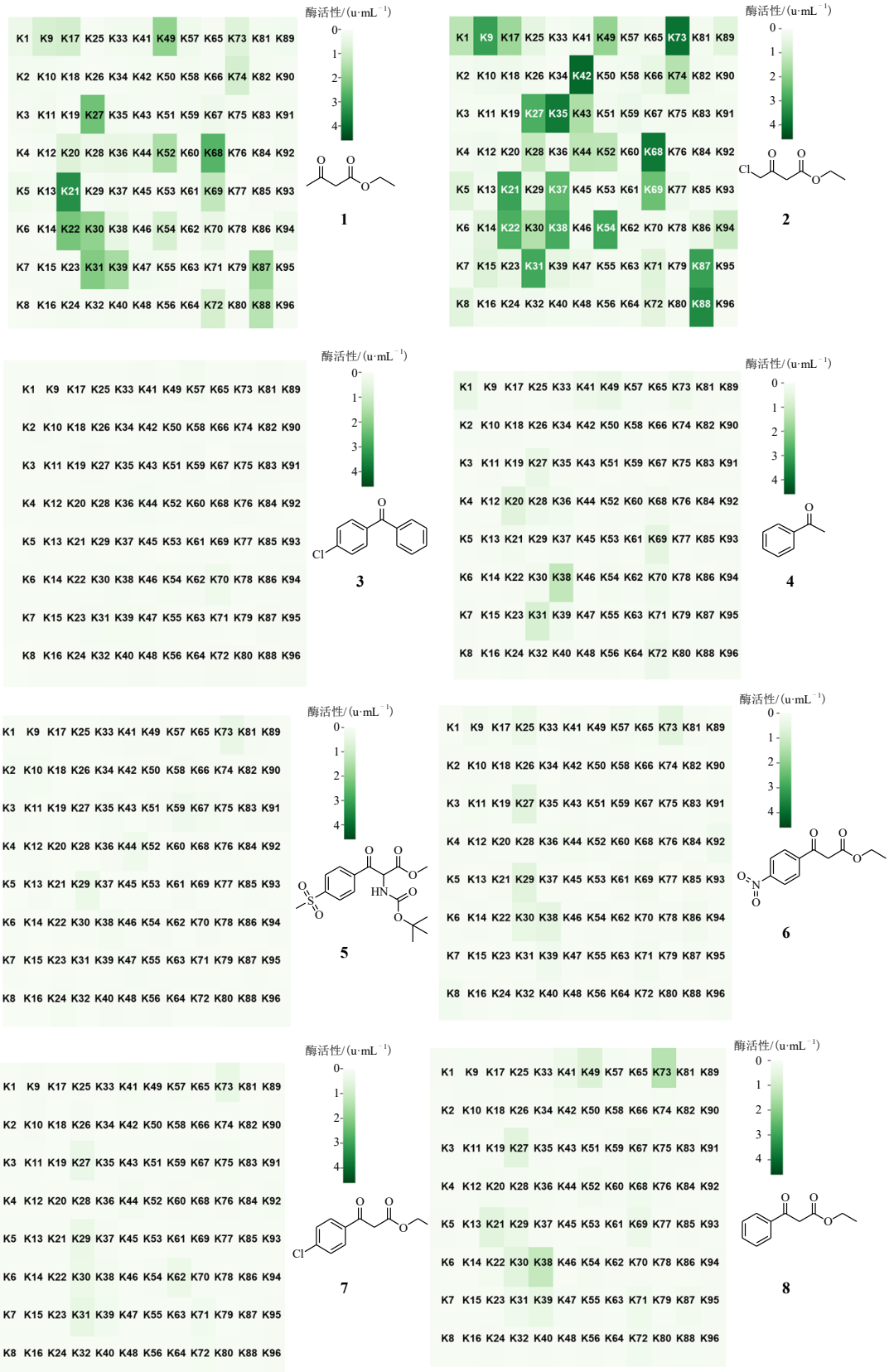


图 3 CREDs 活性筛选

Fig. 3 Activity Screening of CREDs

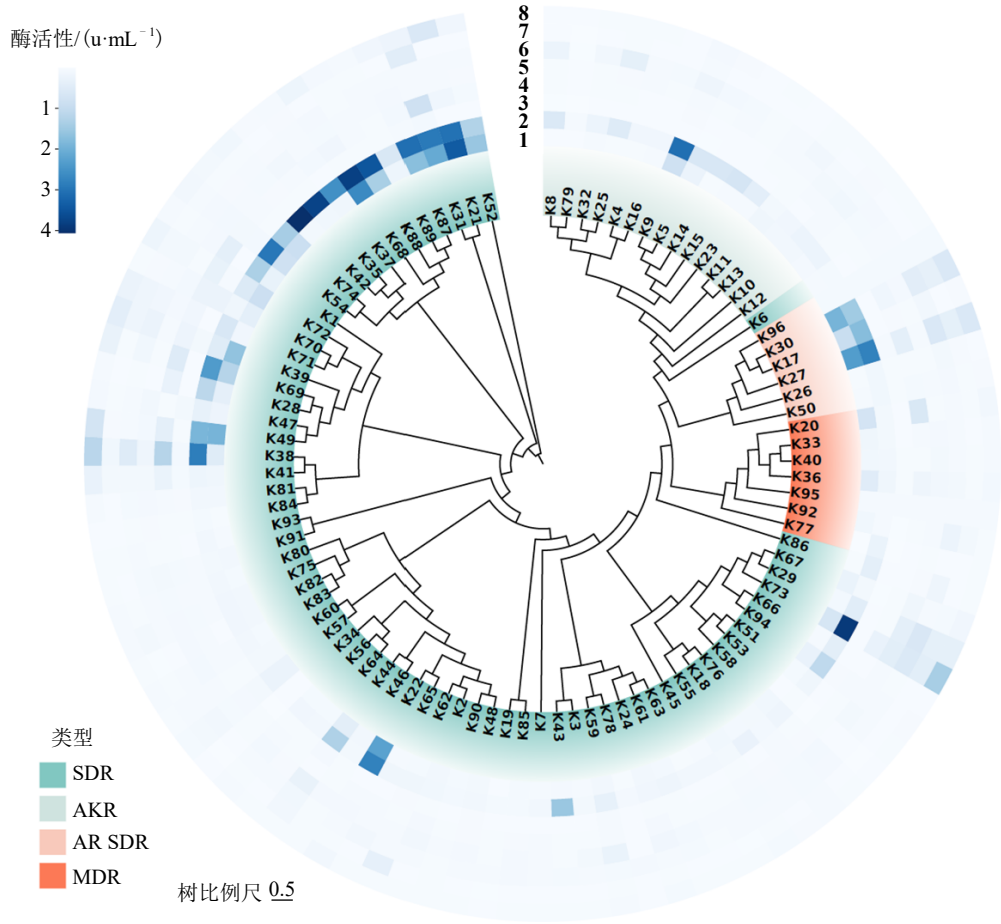


图 4　96 种 CRED 进化树分析

Fig. 4　Phylogenetic Tree Analysis of CREDs

圈），L199 和 A202 位于小口袋（图 5 实线圈）。由于 K39 小口袋中发生 L199H 和 A202L 突变，导致其小口袋缩小，更适合结合—CH_3(0.031 nm^3)。而 K69 小口袋略大于 K39，因此更适合容纳—CH_2Cl(0.068 nm^3)。这与催化活性测试结果一致，K69 倾向于催化 **2**，K39 倾向于催化 **1**。

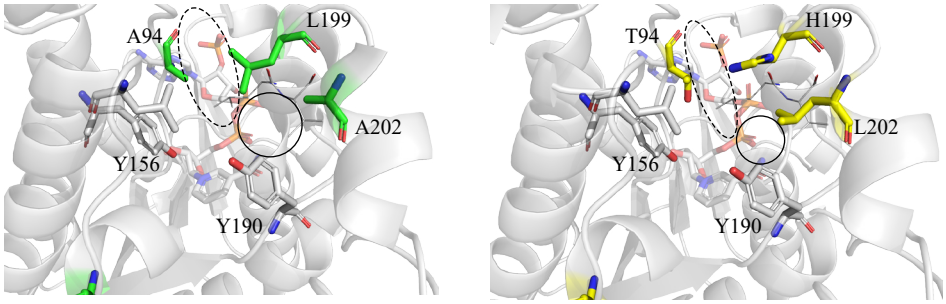
因此综合氨基酸序列对比、进化树分析、结构对比分析和催化活性测试分析，底物结合口袋处的氨基酸序列是影响酶催化活性和立体选择性的关键因素。

2.7　CRED 制备手性醇

(*R*)-4- 氯 -3- 羟基丁酸酯可用于合成左旋肉碱、(*R*)-4- 氨基 -3- 羟基丁酸和 (*R*)-4- 羟基 -2- 吡咯酮等[12—14]；(*S*)-4- 氯 -3- 羟基丁酸酯可用于合成阿托伐他汀[15]。为了满足工业化生产需求，进一步评估初筛活性较好的 CRED K42、K87 和 K94 合成 (*R*)-4- 氯 -3- 羟基丁酸酯和 (*S*)-4- 氯 -3- 羟基丁酸酯的催化能力。

反应体系：分别取表达 K42、K87 和 K94 的 *E. coli* 重组湿菌体，用 PBS(100 mmol/L，pH 7.0) 配制成含 200 g/L **2**、0.05 g/L $NADP^+$、50 g/L *E. coli* 重组湿菌体、25 g/L 葡萄糖脱氢酶重组湿菌体、300 g/L 葡萄糖、10%（体积分数）DMSO 的反应混合物 50 mL，置 30 ℃恒温摇床中，220 r/min 振荡条件下反应 3 h。在反应期间，用饱和碳酸钠溶液控制反应液 pH 值为 7.0。反应结束后加入二氯甲烷 100 mL 终止反应并萃取产物。

反应转化率通过气相分析检测。色谱条件：色谱柱　HP-1 型 (30 m×0.53 mm×1.5 μm)；汽化温度 220 ℃；检测器温度 280 ℃；柱温 70 ℃，恒温



A B

图 5 CRED K69（A）**和 CRED K39**（B）**口袋结构示意图**

Fig.5 Schematic Diagrams of the Binding Pockets of CRED K69 (A) and CRED K39 (B)

5 min，以 20 ℃ /min 升温到 280 ℃，保持 10 min；氮气流速 4 mL/min；总运行时间 30 min；进样量 2.0 μL。

产物手性通过液相分析。色谱条件：色谱柱 Chiral MD(2)-RH 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 乙腈和 0.5 mol/L 高氯酸钠缓冲液（体积比 20 ∶ 80）；检测波长 205 nm；流速 0.4 mL/min；进样量 10 μL。

结果显示，这些酶具有良好的立体选择性。K42 和 K87 等能催化 200 g/L **2** 合成（*S*）-4- 氯 -3- 羟基丁酸酯，转化率 >99 %，*ee* 值 >99 %。K94 等能催化 200 g/L **2** 合成（*R*）-4- 氯 -3- 羟基丁酸酯，转化率 >99%，*ee* 值 >99%。时空收率均可达 800 g·(L·d)$^{-1}$。因此，KRED library 1.0 中的 CRED 可以替代文献和专利已报道的酶来实现（*S*）-4- 氯 -3- 羟基丁酸酯或（*R*）-4- 氯 -3- 羟基丁酸酯的合成。

此外，利用本研究构建的酶库，已经筛选出用于催化合成替格瑞洛中间体、阿瑞匹坦中间体、甲砜霉素中间体、氟苯尼考中间体、卢立康唑中间体和 MB-07133 中间体的 CRED，经过进一步的酶定向改造，具有工业化应用的前景[16—20]。

3 结论

本研究利用多种基因挖掘策略，克隆、构建了包括 96 个不同来源的 CRED 库（KRED library 1.0），通过 8 种不同类型底物的测试，证实 KRED library 1.0 中的大部分 CRED 的底物谱广且活性高。其中，K42、K87 和 K94 可用于制备（*S*）-4- 氯 -3- 羟基丁酸酯或（*R*）-4- 氯 -3- 羟基丁酸酯，时空收率高达 800 g·(L·d)$^{-1}$，*ee* 值 >99%，具有工业化应用潜力。

参考文献：

[1] MA S K, GRUBER J, DAVIS C, *et al*. A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate [J]. *Green Chem*, 2010, **12**(1): 81-86.

[2] LI Z N, YANG H D, LIU J Y, *et al*. Application of ketoreductase in asymmetric synthesis of pharmaceuticals and bioactive molecules: an update (2018—2020) [J]. *Chem Rec*, 2021, **21**(7): 1611-1630.

[3] HE L, YE W J, XIE Y Y, *et al*. Efficient biocatalytic synthesis of (*R*)-2-chloro-1-(3, 4-difluorophenyl) ethanol by the short-chain dehydrogenase *Pp* KR8 from *Paraburkholderia phymatum* STM815 [J]. *Org Process Res Dev*, 2022, **26**(2): 278-287.

[4] GURUSHANKARA H P. Recent developments in biocatalysis and its influence on the pharmaceutical industry [M]//VISWANATH B. Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry. Amsterdam: Elsevier, 2020: 127-139.

[5] CONSORTIUM U. UniProt: a hub for protein information [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, **43**(Database issue): D204-D212.

[6] CONSORTIUM U. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, **47**(D1): D506-D515.

[7] SHAO Z H, SU B M, YANG S L, *et al*. Rational design of the carbonyl reductase EbSDR8 for efficient biosynthesis of enantiopure (*R*)-3-chloro-1-phenyl-1-propanol [J]. *Appl*

Microbiol Biotechnol, 2020, **104**(21): 9219-9228.

[8] GLIEDER A, FARINAS E T, ARNOLD F H. Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(11): 1135-1139.

[9] CHEN X, LIU Z Q, LIN C P, *et al*. Efficient biosynthesis of ethyl(*R*)-4-chloro-3-hydroxybutyrate using a stereoselective carbonyl reductase from *Burkholderia gladioli* [J]. *BMC Biotechnol*, 2016, **16**(1): 70.

[10] NI Y, LI C X, WANG L J, *et al*. Highly stereoselective reduction of prochiral ketones by a bacterial reductase coupled with cofactor regeneration [J]. *Org Biomol Chem*, 2011, **9**(15): 5463-5468.

[11] AN M D, CAI P, YAN M, *et al*. A novel reductase from *Candida albicans* for the production of ethyl(*S*)-4-chloro-3-hydroxybutanoate [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012, **76**(6): 1210-1212.

[12] LIU X, CHEN R, YANG Z W, *et al*. Characterization of a putative stereoselective oxidoreductase from *Gluconobacter oxydans* and its application in producing ethyl(*R*)-4-chloro-3-hydroxybutanoate ester [J]. *Mol Biotechnol*, 2014, **56**(4): 285-295.

[13] ZHOU B N, GOPALAN A S, VANMIDDLESWORTH F, *et al*. Stereochemical control of yeast reductions. 1. Asymmetric synthesis of L-carnitine [J]. *J Am Chem Soc*, 1983, **105**(18): 5925-5926.

[14] MATSUYAMA A, YAMAMOTO H, KOBAYASHI Y. Practical application of recombinant whole-cell biocatalysts for the manufacturing of pharmaceutical intermediates such as chiral alcohols [J]. *Org Proc Res Dev*, 2002, **6**(4): 558-561.

[15] HE Y C, TAO Z C, ZHANG X, *et al*. Highly efficient synthesis of ethyl(*S*)-4-chloro-3-hydroxybutanoate and its derivatives by a robust NADH-dependent reductase from *E. coli* CCZU-K14 [J]. *Bioresour Technol*, 2014, **161**: 461-464.

[16] TANG J W, CHEN L Q, ZHANG L W, *et al*. Structure-guided evolution of a ketoreductase for efficient and stereoselective bioreduction of bulky α-amino β-keto esters[J]. *Catal Sci Technol*, 2021, **11**(20): 6755-6769.

[17] WANG H Y, TANG J W, PENG P, *et al*. Development of a novel chemoenzymatic process for (*S*)-1-(pyridin-4-yl)-1,3-propanediol [J]. *Org Process Res Dev*, 2020, **24**(12): 2890-2897.

[18] TANG J W, WEI T Y, NI G W, *et al*. Development of an efficient and cost-effective enzymatic process for production of (*R*)-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] ethanol using carbonyl reductase derived from *Leifsonia* sp. S749 [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, **188**(1): 87-100.

[19] WEI T Y, TANG J W, NI G W, *et al*. Development of an enzymatic process for the synthesis of (*S*)-2-Chloro-1-(2,4-dichlorophenyl) ethanol [J]. *Org Proc Res Dev*, 2019, **23**(9): 1822-1828.

[20] GUO X, TANG J W, YANG J T, *et al*. Development of a practical enzymatic process for preparation of (*S*)-2-chloro-1-(3,4-difluorophenyl) ethanol [J]. *Org Proc Res Dev*, 2017, **21**(10): 1595-1601.