

综述

放线菌来源的天然产物及其挖掘技术

刘竹青^{1,2}, 王俊潇³, 徐飞^{3*}, 罗学刚^{1*}¹天津科技大学生物工程学院工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457;²齐鲁晟华制药有限公司, 德州 251500; ³浙江大学医学院药物生物技术研究所, 杭州 310000)

摘要: 以初级代谢产物为前体, 合成一些对微生物生命活动并无明显功能但结构较为复杂的物质即次级代谢产物, 也称天然产物。微生物天然产物具有丰富的骨架多样性和结构复杂性, 且这些物质大多具有抗菌、杀虫、抗肿瘤等活性, 是抗生素等先导化合物的重要来源, 在新药研发过程中具有巨大优势, 并广泛应用于人类医药、农业、化工等多个领域。本文综述了近几年来放线菌来源的天然产物及其挖掘策略的研究进展。

关键词: 放线菌; 天然产物; 挖掘策略

Natural products derived from actinomycetes and their mining techniques

LIU Zhuqing^{1,2}, WANG Junxiao³, XU Fei^{3*}, LUO Xuegang¹¹Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology of the Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; ²Qilu Synva Pharmaceutical Co., Ltd, Dezhou 251500, China; ³Institute of Pharmaceutical Biotechnology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310000, China)

Abstract: Secondary metabolites, also known as natural products, are substances with complex structures synthesized from primary metabolites as precursors but no obvious functions in microbial life activities. Microbial natural products possess rich skeletal diversity and structural complexity, and most of these substances exhibit activities such as antibacterial, insecticidal, and antitumor properties. They are important sources of lead compounds such as antibiotics and have significant advantages in the process of new drug development, with wide applications in various fields such as human medicine, agriculture, and chemical industry. This paper reviews the recent research progress of actinomycetes-derived natural products and their mining strategies.

Key Words: actinomycetes; natural products; mining strategies

放线菌是一类高(G+C) MOL%含量的革兰氏阳性细菌^[1], 在自然界中分布广泛, 主要以孢子或菌丝体的状态分布在土壤中, 代表种属有放线菌属、链霉菌属、诺卡氏菌属、小单孢菌属等^[2]。其

中, 最具有经济价值和医学意义的是链霉菌属, 目前大多数抗生素都是从链霉菌中分离得到的。泰乐菌素(Tylosin)^[3]也称泰乐霉素, 是1959年首次从弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)中分离得到的

收稿日期: 2024-07-25

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFF1103702)

第一作者: E-mail: liuzq0710@163.com

*通信作者: 徐飞, E-mail: fxu23@zju.edu.cn; 罗学刚, E-mail: luoxuegang@tust.edu.cn

大环内酯类抗生素, 在临床上主要应用于预防和治疗由病原体引起的呼吸道感染疾病, 目前已成为预防畜禽支原体疾病的首选药物。链霉素(Streptomycin)^[4]是从灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)中分离得到的氨基糖苷类抗生素, 是继青霉素后第二个成功进入临床使用的抗生素药物。链霉素的作用机制是通过与结核杆菌蛋白结合, 干扰结核杆菌蛋白合成, 从而抑制结核杆菌生长。截至目前, 链霉素仍是治疗结核杆菌的主要用药。红霉素^[5](Erythromycin)是从红色链丝菌(*Streptomyces erythreus*)中分离得到的碱性抗生素, 是首个大环内酯类抗生素, 临床上主要应用于呼吸道感染、金黄色葡萄球菌皮肤感染等疾病。除此之外, 放线菌具备产生多种维生素的能力, 为维生素的来源开辟了新的途径。在农业领域, 利用放线菌产生的维生素B族, 可以增强植物的抗逆性, 提高农作物的产量和品质。在饲料工业领域, 添加由放线菌产生的维生素K, 能够改善动物的凝血功能。本文就近年来放线菌来源的具有代表性的天然产物及其挖掘技术进行了汇总, 并对该领域未来的研究重点进行展望。

1 放线菌来源的次级代谢产物

近年来, 从海洋和陆地中分离到的放线菌能够产生结构多样的次级代谢产物。近十年来, 国内外报道了从极地放线菌中分离得到的104个次级代谢产物, 其中新化合物数量为44个, 占比42.3%。主要结构类型为萜醌类、聚酮类、生物碱类等^[6]。

1.1 生物碱类化合物

生物碱(alkaloids)是自然界中一类含氮的碱性

有机化合物, 并且大多具有复杂的环状结构, 氮原子结合在环内, 有显著生物活性。按照生物碱的结构类型主要有吲哚类、咪唑类、甾体类、吡啶等。一般情况下, 除了核酸、氨基糖、氨基酸、肽类、核苷酸、蛋白质以及含氮微生物等动、植物必须含氮的有机物外, 其他含氮化合物均可视为生物碱。生物碱类天然产物在人类健康方面发挥重要作用。目前被批准使用的临床药物中, 75%为生物碱类化合物^[7]。

Al Subeh等^[8]从帚枝霉属(*Sarocladium* sp.)中分离得到的化合物Embellicine A-E(图1)能够抑制乳腺癌细胞(MDA-MB-231)活性, 其作用范围在0.4~4.8 $\mu\text{mol/L}$ 。除此之外, 化合物Embellicine A和Embellicine E对人卵巢癌细胞(OVCAR3)和黑色素瘤细胞(MDA-MB-435)具有活性。

Le等^[9]从海洋链霉菌CNQ-490菌株中分离得到两个新化合物Lodopyridone B、Lodopyridone C以及1个已知化合物Lodopyridone A(图2), 并通过活性测试发现, Lodopyridone A-C均能够抑制 β -淀粉样蛋白前体蛋白裂解酶, 进而阻止 β -淀粉样蛋白肽(A β)的合成。这一重要发现推动了对阿尔兹海默病(AD)的研究。

1.2 大环内酯类化合物

大环内酯类化合物是由一个多元碳内酯环附着的一个或者多个脱氧糖形成的一类聚酮化合物, 呈弱碱性, 主要由链霉菌产生, 作用机理是阻断肽酰转移酶活性^[10], 从而抑制细菌蛋白质生成。大环内酯类药物主要分为大环内酯类抗生素、酮内酯类抗生素、非抗菌类大环内酯类药物、毒性大环内酯类药物等。大环内酯类抗生素的结构类型主要有十四元环、十五元环、十六元环。其中,

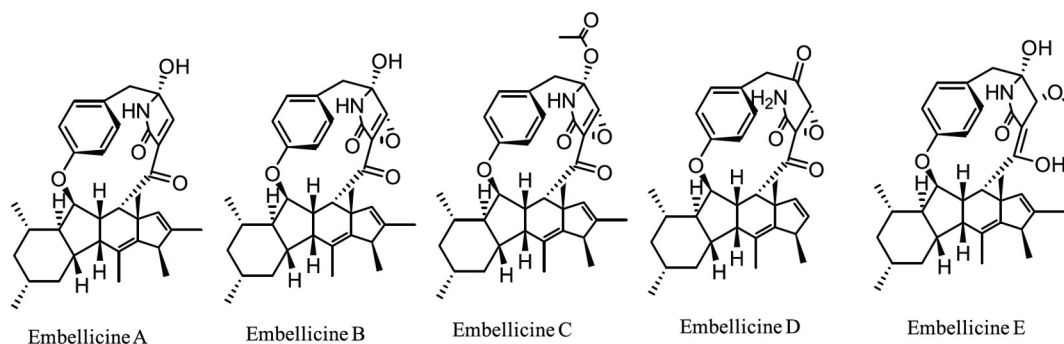


图1 帚枝霉属菌产生的部分生物碱类化合物

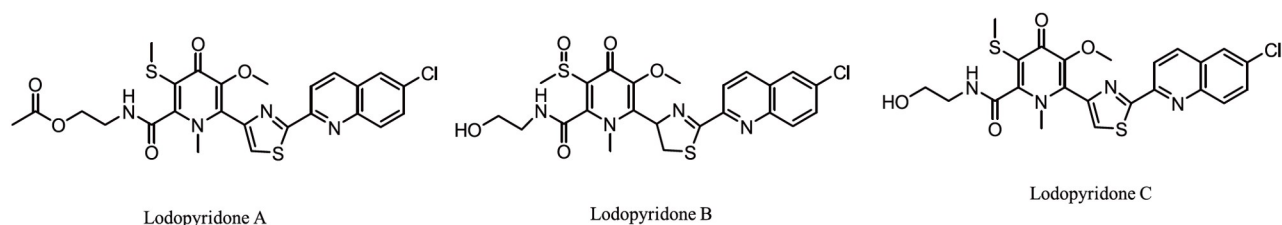


图2 海洋链霉菌产生的部分化合物

克拉霉素、红霉素等属于十四元环大环内酯类；阿奇霉素属于十五元环大环内酯类；螺旋霉素属于十六元环大环内酯类^[11]。

Liu等^[12]从银色链霉菌(*Streptomyces argenteolus*)中分离得到2个糖基化聚酮-肽杂化的大环内酯argenteolides A和argenteolides B(图3), 进而借助化学衍生化法、核磁共振波谱(nuclear magnetic resonance, NMR)、电子圆二色谱(electronic circular dichroism, ECD)计算等方法, 确定了其绝对构型和相对构型。argenteolides A的二十元大环中包括一个结构非常独特的5/5/5三环耦合系统。对该菌株的基因组测序和生物信息学分析发现, 编码argenteolides的BGCs前体为2-甲基丁酰丙二酰辅酶A, 推测由3-羟基丁酰辅酶A脱氢酶(Agt28)、酮基合酶(Agt27)和巴豆酰辅酶A还原酶催化合成。两个细胞色素P450酶Agt23和Agt30

可能负责argenteolides骨架的羟基化并促使分子内三环形成, 而糖基单元可能由糖基转移酶催化形成。化合物argenteolides A和argenteolides B均对人癌细胞株(A549、p388、HeLa)具有很强的细胞毒性, 并且对金黄色葡萄球菌具有一定的抗菌活性。

Yang等^[13]通过对上百株放线菌进行基因测序和生物信息学分析, 从海绵附生放线菌(*Streptomyces somaliensis*)中分离得到具有独特环系的大环内酯类化合物Somalactams A-D(图4), 并初步推测了生物合成途径, 提出Somalactams主要由一个特殊的羟酰基辅酶A合成, 其结构中4-甲基己酰基单元由巴豆酰辅酶A羧化酶、酮基合酶、3-羟基丁酰辅酶A脱氢酶催化合成, 并通过基因敲除实验证明了*sml*基因簇负责Somalactams这一类化合物的生物合成, 为研究大环内酯的酶机制提供了重

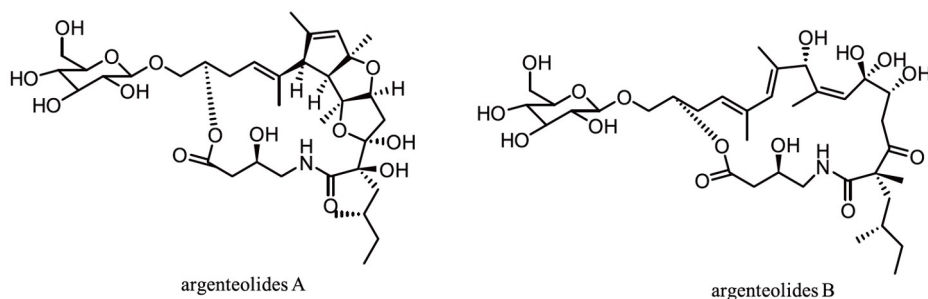


图3 银色链霉菌产生的部分大环内酯类化合物

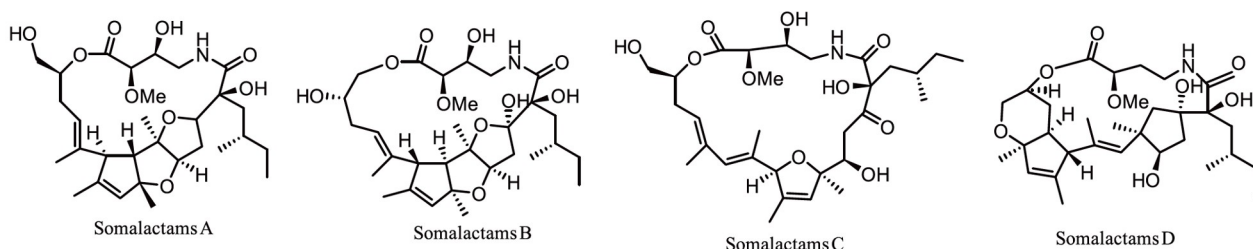


图4 放线菌产生的部分大环内酯类化合物

要参考。通过生物活性测试发现, Somalactams A 具有显著抗炎活性, 可作为一种重要的药物开发先导化合物进行深入研究。

1.3 芳香聚酮及其他聚酮类化合物

聚酮类化合物主要是由聚酮合酶催化形成聚酮母核, 再经过糖基化、甲基化、羟基化等修饰形成活性分子, 因具有极高的经济价值和良好的药理活性^[14], 是微生物次级代谢产物的重要组成部分。大多数聚酮类化合物具有抗肿瘤、免疫抑制、抗菌、抗病毒等重要活性, 广泛应用于医药、化工等各个领域。关于该类化合物的异源合成一直是合成生物学领域研究的热点。

Xie等^[15]从喜盐涅斯特连科氏菌(*Nesterenkonia halobia*)中分离得到了笼状聚酮类化合物nesteretal A, 通过多种光谱学手段确定其结构构型(图5)。对生物合成途径进行初步推导, 2,3-丁二酮通过双羟醛进行缩合反应, 然后通过半缩醛反应得到目标产物。该化合物对于维甲酸X受体 α (RXR α)具有一定的转录激活作用, 说明在抗肿瘤药物研究方面可能具有潜在价值。

Sun等^[16]从链霉菌SCSSIO 40069中分离到一类芳香类聚酮化合物, 其中16-19为新化合物, 20-22为已知化合物, 通过NMR和HR-MS等波谱技术确定平面结构, 并借助X-ray单晶衍射确定其绝对构型(图6)。

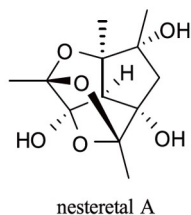


图5 喜盐涅斯特连科氏菌产生的部分笼状聚酮类化合物

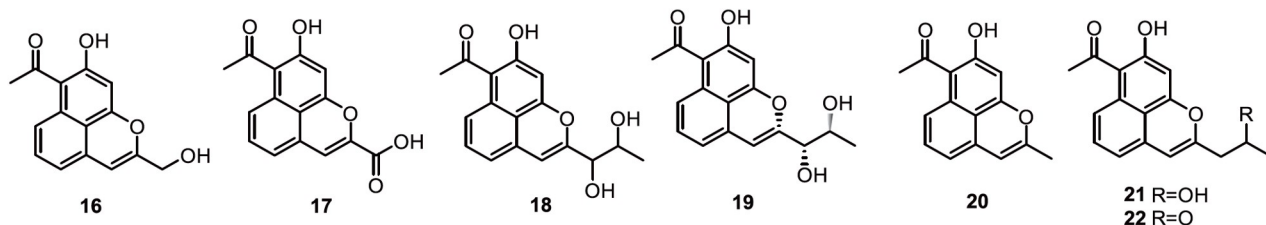


图6 链霉菌SCSSIO 40069产生的部分化合物

1.4 萜类化合物

萜类化合物是自然界中数量最为庞大的一类微生物天然产物, 分子式为异戊二烯单位的倍数的含氧类衍生物或者烃类^[17], 代表性化合物有紫杉醇、青蒿素等。萜类化合物通常具有止咳、驱虫、阵痛、抗癌等生理活性, 并且广泛应用于医药、食品以及化妆品行业。其中, 以类胡萝卜素为代表的四萜类化合物广泛应用于医药行业。

Keller等^[18]在沙漠来源的放线菌(*Kibdelosporangium persicum* sp.nov.)中分离得到一类糖基化的多环萜类化合物Persicamidines A-E(图7)。这类化合物一侧是被修饰的糖部分, 和异脲部分与萜类结构融合在一起, 并且这一类化合物对SARS-CoV-2和hCoV-229E具有抗冠状病毒的活性, 这使得Persicamidines类化合物为药物研发提供了可能。

Li等^[19]通过基因组挖掘、结构生物学和计算化学等策略, 从委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*) ATCC 15439中鉴定出沉默基因簇Ven, 发现了两个具有A5-5-6-7四环骨架的天然芳香二萜产物(28-29)(图8), 并且阐述了二萜合酶Ven A的环化机理, 为萜类骨架的环化反应提供了重要的分子基础。

2 微生物天然产物挖掘方法

微生物天然产物挖掘是指运用一系列科学的技术和方法, 对微生物(细菌、真菌、放线菌等)所产生的具有潜在应用价值的化学物质进行分离、鉴定和表征的过程^[20]。目前天然产物挖掘方法主要包括生物活性导向分离、基因组挖掘、代谢组学分析、共培养技术等。

2.1 传统天然产物挖掘方法

长期以来, 微生物天然产物一直是药物中重要

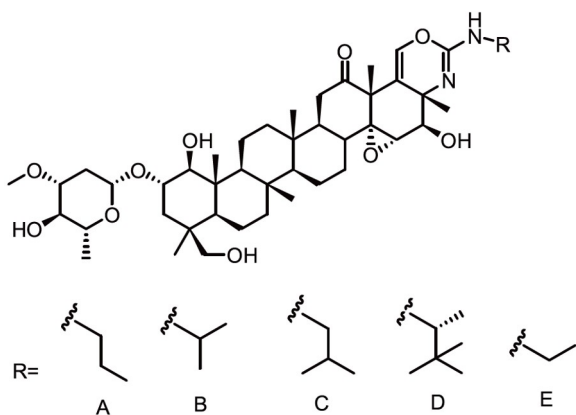


图7 放线菌产生的部分萜类化合物

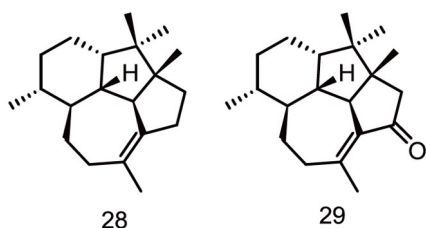


图8 委内瑞拉链霉菌产生的部分萜类化合物

的活性组成部分，为人类生存做出巨大贡献，尤其是在癌症和传染性疾病方面。自青霉素被发现以来，彻底改变了现代医学，大大延长了人类寿命^[21]。然而，从20世纪90年代末期开始，传统的基于生物活性的天然药物筛选方法导致大量已知化合物的重复分离，结构新颖的活性化合物的发现进程逐渐放缓，如何高效地人工创造或者靶向

分离新型天然药物已成为次级代谢产物挖掘的研究热点。伴随着基因组学、蛋白组学、代谢组学等新的挖掘策略和分析手段的不断成熟，天然产物研究进入一个崭新阶段^[22]。

2.2 基于基因组学的天然产物挖掘

基因组学是对生物体所有基因进行定量研究、集体表征以及对不同基因组进行比较的一门交叉学科。自1981年第一个真核人类线粒体基因组测序完成以来，人们对生物的理解不再局限于实验观测，而是能够通过基因组数据解释内在规律和变化。基因组时代的到来为天然产物的发现提供了更多的可能性和挖掘空间^[23]。测序技术已历经三代，目前第三代单分子测序技术读数长达1万个碱基以上，这为宏基因组的组装提供了良好的铺垫。随着测序技术的不断成熟，测序成本不断降低，又催生了各类型数据库的完善，如天然产物BGCs数据库MiBiG^[24](<https://mibig.secondarymetabolites.org>)、核酸序列数据库NCBI^[25](<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)等。简单来说，基因组挖掘就是对微生物基因组测序结果中未表征的天然产物的BGCs所编码的酶进行序列分析，并对其产物进行分离鉴定。图9展示了基于基因组挖掘微生物天然产物的过程中，需要化学手段分析(磁共振光谱、质谱、晶体学、红外)、分子生物学方法(基因组测序、异源表达、分子克隆、Southern印迹杂交)、生物活性测试以及通过生物信

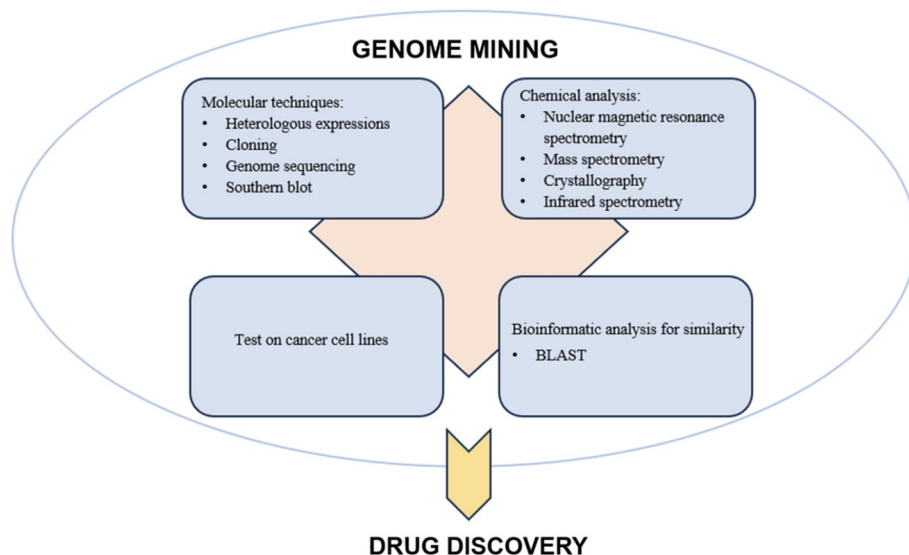


图9 基因组挖掘天然产物的流程

息学指导(national center for biotechnology information-basic local alignment search tool, NCBI-BLAST)等多学科助力, 有助于研究者更深入地了解微生物的生理和代谢过程及原理, 同时能够发现新的药物作用靶点和作用机制。通过更新技术手段, 更多的微生物天然产物被发现并应用于各个领域, 为新药研发提供新的思路和方法, 从而推动生命科学和医药业的进步和发展, 为人类的健康和生活提供更多福祉。

大量基因组测序结果发现, 微生物编码的BGCs多于表达的BGCs^[26]。基因组挖掘需要通过生物信息学分析工具, 如PRISM(prediction informatics for secondary metabolomes, <https://prism.adapsyn.com/results>)预测结构域的组成, ClustScan能够根据基因组测序结果预测基因簇和结构域, RiPPMiner可以预测RiPPs(ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides, RiPPs) BGCs, NRPSpredictor用于预测非核糖体肽合成酶类基因簇腺苷酰化结构域的特异性^[27], NaPDoS(natural product domain seeker, <https://npdomainseeker.sdsc.edu>)预测NRPS、PKS(polyketide synthase)结构域的组成^[28], CLUSEAN^[29]用于分析预测哪些微生物是最优的次级代谢产物产生菌。antiSMASH是目前使用最多的分析工具。antiSMASH可以预测NRPS和PKS结构域的BGCs注释以及核心基因的预测, 对比未知和已知的BGCs。BiG-SCAPE^[30]作为BGCs聚类 and 分类平台, 能够根据antiSMASH分析结果进行化合物结构相似性谱图网络分析。近年来, 基因组测序技术结合生物信息学工具挖掘新的天然产物的方法日趋成熟, 如图10所示的放线菌挖掘BGCs的基本流程^[31], 通过对目标菌株进行基因组测序, 将测序结果上传至antiSMASH、PRISM、MiBiG等对其BGCs进行预测分析; 对于分离得到的化合物, 通过LC-MS、NMR等波谱技术对结构进行解析鉴定。这样就可以将基因与化合物联系在一起, 科研人员可以利用BGCs的知识来预测其合成化合物可能的结构类型。反过来, 我们也可以根据化合物的结构来推测负责该化合物生物合成的基因簇, 从而解析其生物合成途径。

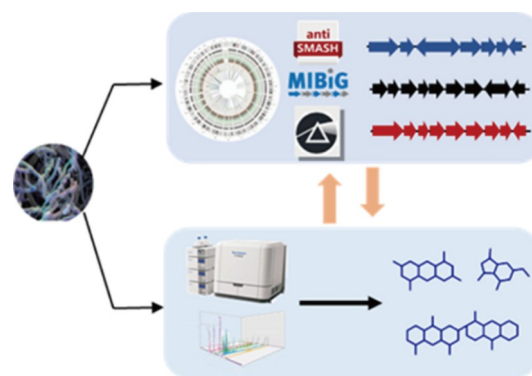


图10 基于基因组学挖掘放线菌BGCs的流程

2.3 基于质谱代谢组学的天然产物挖掘

代谢组学是在基因组学、蛋白质组学之后发展起来的一门学科, 研究生物体内所有小分子代谢产物的组成与结构特征, 主要应用于医药研发、毒理学、疾病诊断等与人类生活密切相关的领域^[32]。代谢组学的研究通常需要利用质谱(mass spectrometry, MS)进行代谢产物的分析鉴定。随着质谱技术的不断发展和进步, 质谱代谢组学^[33]作为一种新兴的代谢组学研究方法应运而生。

质谱分析^[34]就是将不同类型的化合物分子在离子源中发生电离, 生成不同质荷比(mass to charge ratio, m/z)的离子, 再根据 m/z 大小排列得到的图谱进行分析的实验方法。自20世纪50年代“官能团对分子中化学键的断裂有引导作用”被提出以来, MS逐渐成为化合物鉴定的重要方法之一。与NMR、红外光谱(infrared spectroscopy, IR)、UV相比, MS具有以下优点: 一是灵敏度高, 通常只需要1 μ L待测样品就能够检测出结果, 对于从微生物中分离到的微量化合物来说, MS是最为有效的检测方法; 二是对于没有紫外吸收的化合物, MS可以作为一种追踪和检验纯度的方法; 三是质谱的分析速度快, 可以与HPLC、气相色谱联用(gas chromatography mass spectrometry, GC)进行混合物的分离解析。

质谱代谢组学主要包括 MS^1 (mass spectrometry¹, MS^1)代谢组学和 MS^2 (mass spectrometry², MS^2)代谢组学, 分别代表质谱技术在代谢组学研究中的两个不同层次。 MS^1 和 MS^2 结合使用, 能够获得全面、准确的代谢产物信息^[35]。 MS^1 代谢组学指的是通过不同的离子化方式, 对样品中的化合物进行离子化和质谱扫描,

从而获得化合物的m/z和丰度信息,帮助研究者进行初步分析和定量。 MS^2 是通过对 MS^1 获得的分子离子进行碎裂,获得碎片信息,从而增加物质结构推断的准确性,深入了解结构特征。

除此之外,天然产物分子网络平台GNPS (natural products social molecular networking, <http://gnps.ucsd.edu>)^[36]目前已经正式公开使用,能够对代谢组中的质谱数据进行分析检索,目前广泛应用于代谢组学的分析领域,已经为超过150个国家的科研工作者提供了便利和帮助。GNPS能够基于结构碎片的相似性对化合物的同系物进行聚类分析。

3 结语

放线菌来源的天然产物在医疗卫生、食品化工等领域做出巨大贡献,并且是目前市场上抗生素的主要来源。但由于传统分离方法的局限性以及初级代谢产物、培养基组分和分离过程中塑化剂等信号成分的干扰,结构新颖的天然产物的发现率在显著下降。因此,目前迫切需要基因组学、质谱组学等多组学技术相结合,更高效地挖掘更多结构新颖且具有活性的天然产物。

参考文献

- [1] Kim ES. Recent advances of actinomycetes. *Biomolecules*, 2021, 11(2): 134
- [2] Selim MSM, Abdelhamid SA, Mohamed SS. Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *J Genet Eng Biotechnol*, 2021, 19(1): 72
- [3] 蒋玉婷, 朱慧, 贾晨波, 等. 弗氏链霉菌泰乐菌素还原酶基因编辑及其对泰乐菌素发酵产物的影响. *中国抗生素杂志*, 2023, 48(5): 518-523
- [4] Silver HK, Kempe CH. Mechanism of the development of resistance to streptomycin. *Am J Med*, 1947, 2(6): 660-661
- [5] Ying L, Tang D. Recent advances in the medicinal chemistry of novel erythromycin-derivatized antibiotics. *Curr Top Med Chem*, 2010, 10(14): 1441-1469
- [6] 张举成, 杨雪琼, 周皓, 等. 2006–2018年稀有放线菌中的新天然产物. *有机化学*, 2019, 39(4): 982-1012
- [7] 李林喆, 姚彤, 毛联岗, 等. 海洋天然产物喹啉类生物碱的生物活性研究进展. *化学与生物工程*, 2021, 38(3): 1-5, 19
- [8] Al Subeh ZY, Flores-Bocanegra L, Raja HA, et al. Embellicines C-E: macrocyclic alkaloids with a cyclopenta[b]fluorene ring system from the fungus *Sarocladium* sp. *J Nat Prod*, 2023, 86(3): 596-603
- [9] Le TC, Yim CY, Park S, et al. Lodopyridones B and C from a marine sediment-derived bacterium *Saccharomonospora* sp.. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27(14): 3123-3126
- [10] Al-Fadhli AA, Threadgill MD, Mohammed F, et al. Macrolides from rare actinomycetes: structures and bioactivities. *Int J Antimicrob Agents*, 2022, 59(2): 106523
- [11] Amsden GW. Advanced-generation macrolides: tissue-directed antibiotics. *Int J Antimicrob Agents*, 2001, 18: 11-15
- [12] Liu Z, Yashiroda Y, Sun P, et al. Argenteolides A and B, glycosylated polyketide-peptide hybrid macrolides from an actinomycete *Streptomyces argenteolus*. *Org Lett*, 2023, 25(4): 571-575
- [13] Yang F, Sang M, Lu J, et al. Somalactams A-D: anti-inflammatory macrolide lactams with unique ring systems from an arctic actinomycete strain. *Angew Chem Int Ed*, 2023, 62(18): e202218085
- [14] Li P, Chen M, Tang W, et al. Initiating polyketide biosynthesis by on-line methyl esterification. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4499
- [15] Xie CL, Chen R, Yang S, et al. Nesteretal A, a novel class of cage-like polyketide from marine-derived actinomycete *Nesterenkonia halobia*. *Org Lett*, 2019, 21(20): 8174-8177
- [16] Sun L, Zhu H, Zhang L, et al. Aromatic polyketides from the mangrove-derived *Streptomyces* sp. SCSIO 40069. *J Nat Prod*, 2023, 86(4): 979-985
- [17] Oldfield E, Lin F. Terpene biosynthesis: modularity rules. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51(5): 1124-1137
- [18] Keller L, Oueis E, Kaur A, et al. Persicamidines—unprecedented sesquiterpenoids with potent antiviral bioactivity against coronaviruses. *Angew Chem Int Ed*, 2023, 62(6): e202214595
- [19] Li Z, Jiang Y, Zhang X, et al. Fragrant venezuelaenes A and B with A 5-5-6-7 tetracyclic skeleton: discovery, biosynthesis, and mechanisms of central catalysts. *ACS Catal*, 2020, 10(10): 5846-5851
- [20] Katz L, Baltz RH. Natural product discovery: past, present, and future. *J Industrial Microbiol Biotechnol*, 2016, 43(2-3): 155-176
- [21] Kenshole E, Herisse M, Michael M, et al. Natural product discovery through microbial genome mining. *Curr Opin Chem Biol*, 2021, 60: 47-54
- [22] Schrimpe-Rutledge AC, Codreanu SG, Sherrod SD, et al. Untargeted metabolomics strategies—challenges and emerging directions. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2016, 27(12): 1897-1905

- [23] van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, et al. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet*, 2014, 30(9): 418-426
- [24] Terlouw BR, Blin K, Navarro-Muñoz JC, et al. MIBiG 3.0: a community-driven effort to annotate experimentally validated biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res*, 2022, 51(D1): D603-D610
- [25] Schoch C L, Ciufo S, Domrachev M, et al. NCBI taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford), 2020, 2020: baaa062
- [26] 胡嘉琪. 多组学驱动的微生物天然产物的发现及生物合成研究[D]. 济南: 山东大学, 2024
- [27] Röttig M, Medema MH, Blin K, et al. NRPSpredictor2—a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(suppl_2): W362-W367
- [28] Arulprakasam KR, Dharumadurai D. Genome mining of biosynthetic gene clusters intended for secondary metabolites conservation in actinobacteria. *Microb Pathog*, 2021, 161: 105252
- [29] Weber T, Rausch C, Lopez P, et al. CLUSEAN: A computer-based framework for the automated analysis of bacterial secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *J Biotechnol*, 2009, 140(1-2): 13-17
- [30] Navarro-Muñoz JC, Selem-Mojica N, Mullowney MW, et al. A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(1): 60-68
- [31] Lee N, Hwang S, Kim J, et al. Mini review: genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*. *Comput Struct Biotechnol J*, 2020, 18: 1548-1556
- [32] Cui L, Lu H, Lee YH. Challenges and emergent solutions for LC-MS/MS based untargeted metabolomics in diseases. *Mass Spectrometry Rev*, 2018, 37(6): 772-792
- [33] Wang M, Carver JJ, Phelan VV, et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with global natural products social molecular networking. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(8): 828-837
- [34] Webb IK. Recent technological developments for native mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta*, 2022, 1870(1): 140732
- [35] Bauermeister A, Mannocho-Russo H, Costa-Lotufo LV, et al. Mass spectrometry-based metabolomics in microbiome investigations. *Nat Rev Microbiol*, 2022, 20(3): 143-160
- [36] Huo C, Nguyen QN, Alishir A, et al. Global natural products social (GNPS)-based molecular-networking-guided isolation of phenolic compounds from ginkgo biloba fruits and the identification of estrogenic phenolic glycosides. *Plants*, 2023, 12(23): 3970