

# PepOSX在食品多肽组学鉴定分析中的应用与评价

刘万顺<sup>1</sup>, 郑淋<sup>2</sup>, 李文治<sup>3</sup>, 刘磊<sup>1,4</sup>, 岑幸仪<sup>1,4</sup>, 陈天鸽<sup>1</sup>, 周梓航<sup>1</sup>, 徐巨才<sup>1,4\*</sup>, 赵谋明<sup>2\*</sup>

(1. 五邑大学药学与食品工程学院, 广东江门 529020) (2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (3. 无限极(中国)有限公司, 广东江门 529020) (4. 江门市大健康国际创新研究院, 广东江门 529020)

**摘要:** 多肽组学分析是解析加工过程中多肽变化规律的关键。该文主要就 PepOSX 软件在已知肽混标和食源性蛋白酶解产物中的多肽组学鉴定应用效果进行评价, 并探讨了不同鉴定方式、工作参数对单多肽检出率和鉴定结果准确率的影响。结果表明: Exhaust 引擎在不依赖序列库的条件下, 对胶原蛋白和酪蛋白肽混标的鉴定结果准确率分别为 67.86% 和 36.36%, 对应准确检出率达 80% 和 100%, 反映该引擎对发现未知短肽具有较好的适应性; Search 引擎基于序列搜库, 对前述混标的鉴定结果准确率分别高达 71.43% 和 90.48%, 检出率分别高达 91.30% 和 100%, 展现对已知蛋白源样品分析的优越性能。将上述引擎联动用于酶解产物的组学分析, 并将其与 SEQUEST、MyriMatch 和 X! Tandem 进行对比, 发现 PepOSX 的准确检出率远优于其他三者, 且在酪蛋白、大豆蛋白酶解产物的鉴定中获得了约 3~4 倍于后者的鉴定数量, 充分展示了 PepOSX 在非特异性多肽鉴定中的适用性与可靠性。未来, PepOSX 将有望为探索新活性肽或揭示多肽变化机制提供有效的技术支持。

**关键词:** PepOSX; 多肽组学; 多肽; 结构鉴定; 活性肽

文章编号: 1673-9078(2024)12-91-97

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.12.1490

## Application and Evaluation of the PepOSX Workstation in Peptidomic Analysis of Food-derived Protein Hydrolysates

LIU Wanshun<sup>1</sup>, ZHENG Lin<sup>2</sup>, LI Wenzhi<sup>3</sup>, LIU Lei<sup>1,4</sup>, CEN Xingyi<sup>1,4</sup>, CHEN Tiange<sup>1</sup>, ZHOU Zihang<sup>1</sup>, XU Jucal<sup>1,4\*</sup>, ZHAO Mouming<sup>2\*</sup>

(1. School of Pharmacy and Food Engineering Wuyi University, Jiangmen 529020, China)

(2. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(3. Infinitus (China) Commodity Co. Ltd., Jiangmen 529020, China) (4. International Healthcare Innovation Institute (Jiangman), Jiangmen 529020, China)

**Abstract:** Peptidomic analysis is the key to elucidating the changing trend of peptides during processing. In this paper, the performance of the PepOSX software in peptidomic identification of the peptides in food-derived protein hydrolysates is evaluated, and the influence of different identification methods and work parameters on the detection rate and identification accuracy of single peptides is discussed. The results show that the Exhaust engine, independent of the sequence library, has identification accuracy rates of 67.86% and 36.36% for collagen and casein peptide mixtures, with corresponding accurate detection rates of 80% and 100%, reflecting the engine's good adaptability for discovering unknown short peptides; the Search engine, based on sequence search, has identification accuracy rates of 71.43% and 90.48% for the above mixtures, with detection rates of 91.30% and 100%, demonstrating superior performance in the analysis of known protein source samples. The above engines are linked for the analysis of enzyme hydrolysis products, and compared with SEQUEST, MyriMatch and X! Tandem, it is found that PepOSX has a significantly higher accurate detection rate than the other three, and obtains about 3-4 times as many identifications as the latter in the identification of casein and soybean protein hydrolysis products, fully demonstrating the applicability and reliability of PepOSX in non-specific peptide identification. In the future, PepOSX is expected to provide effective technical support for exploring new active peptides or revealing the mechanism of peptide changes.

引文格式: 刘万顺, 郑淋, 李文治, 等. PepOSX在食品多肽组学鉴定分析中的应用与评价[J]. 现代食品科技, 2024, 40(12): 91-97.

LIU Wanshun, ZHENG Lin, LI Wenzhi, et al. Application and evaluation of the PepOSX workstation in peptidomic analysis of food-derived protein hydrolysates [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(12): 91-97.

收稿日期: 2023-12-14

基金项目: 广东省科技创新战略专项市县科技创新支撑(大专项+任务清单)项目-暨2023年江门市关键核心技术“揭榜挂帅”制项目(2023780200060009632); 广东省基础与应用基础研究基金联合基金青年基金项目(2022A1515110711); 五邑大学创新创业基金项目(2023111500000432; 5081700304XJ)

作者简介: 刘万顺(1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物信息技术与肽组学分析技术, E-mail: 15915840735@163.com

通讯作者: 徐巨才(1991-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物信息技术与食品智造技术, E-mail: xujucal.happy@163.com; 共同通讯

作者: 赵谋明(1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物信息技术, E-mail: femmzhao@scut.edu.cn

spiked with known peptide standards was evaluated, and the effects of different identification approaches and working parameters on the detection rates and accuracy of single peptides were studied. For the sequence database-independent analysis of the known collagen and casein peptide standard mixtures, the accuracy rates of the Exhaust engine were 67.86% and 36.36%, respectively, and the corresponding detection rates reached 80% and 100%, respectively, indicating the good adaptivity of the engine for discovering unknown short peptides. The accuracy rates of the Search engine based on sequence database for the identification of the above-mentioned mixed standards were as high as 71.43% and 90.48%, respectively, with the corresponding detection rates being 91.30% and 100%, showing the superior capabilities of the engine in analyzing peptides from the samples with known protein sources. The above-mentioned engines were combined and applied in peptidomic analysis of protein hydrolysates. Compared with the performance of SEQUEST, MyriMatch and X! Tandem, PepOSX has a much higher accuracy rate, and the number of identified peptides from the casein and soybean protein hydrolysates was about 3~4 times that of the latter. This fully demonstrated the applicability and reliability of the PepOSX workstation in the identification of non-specific peptides. In the future, PepOSX is expected to provide effective technical support for exploring new bio-active peptides or revealing the mechanism underlying the changes in peptides.

**Key words:** PepOSX; peptidomics; peptide; structure identification; bioactive peptides

食源性生物活性肽广泛应用于生物医药、功能食品与保健品等领域，是当前食品科学研究关注的焦点之一<sup>[1,2]</sup>。然而，由于酶解或发酵过程中蛋白序列的降解缺乏特异性，产物中常呈现极其复杂的非特异性多肽组成<sup>[3]</sup>，尚缺乏有效的肽组学鉴定分析技术，对探索加工过程中多肽的释放和变化规律形成了阻碍，也制约了多肽相关科学研究和产业的进一步发展。

目前，食品酶解或发酵产物中多肽的鉴定分析大多借鉴采用蛋白质组学分析工具，如 MASCOT<sup>[4]</sup>、SEQUEST<sup>[5]</sup>、MaxQuant、Peaks<sup>[7]</sup>等。这些工具为蛋白质组质谱数据的读取、特异性多肽鉴定和结果可视化提供了高效而成熟的技术，并对非特异性多肽的组学分析展现了一定的适应性<sup>[8]</sup>。但值得注意的是，蛋白质组学分析重点关注特异性多肽，以便解析原样本中的蛋白组成，而多肽组学分析的主要目的在于直接解析样本中的游离多肽组成情况，以便探索新型多肽或其代谢、变化机制<sup>[9]</sup>。这是二者的本质区别，也正因此，基于序列搜库的蛋白质组学工具被多次报道存在食源性多肽鉴定难、通量低等问题<sup>[10]</sup>。相比之下，基于从头测序的方法表现更优，但其鉴定准确率仍有待提高<sup>[11]</sup>。当下，研究建立一种有效的多肽组学鉴定分析技术迫在眉睫。本课题组前期以无穷枚举和序列搜库两种方式建立了 PepOSX 多肽组学鉴定分析技术<sup>[12-14]</sup>，在食源性多肽的组学鉴定分析中展示了巨大潜力<sup>[15]</sup>。

基于此，本文系统研究 PepOSX 不同鉴定方式、工作参数对已知多肽混合标准品鉴定效果的影响，

多角度评价其鉴定准确率，并将其与现有商业蛋白质组学分析软件进行对比，以期为食品乃至生物医药领域多肽组学分析提供的技术指导和实践依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

酪蛋白肽混合标准品、胶原蛋白肽混合标准品，吉尔（上海）生化有限公司；大豆蛋白、胶原蛋白、酪蛋白、玉米蛋白酶解产物，广东华肽生物科技有限公司；乙腈、甲酸（质谱级），美国 Sigma 公司；超纯水，Milli-Q 纯水机，德国 Millipore 公司自制。

### 1.2 主要仪器设备

Secura125-1CN 十万位电子分析天平，德国赛多利斯公司；色谱柱 1×100 mm HSS T3 (1.8 μm, 100 Å)，美国 Waters 公司；高分辨液相色谱-飞行时间质谱联用仪 (X500R LC-ESI-Q-TOF)，美国 AB SCIEX 公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 样品制备

使用超纯水配置混合标准品溶液（单一多肽质量浓度 5 μg/mL）和样品溶液（质量浓度 2 mg/mL），充分溶解后过 0.22 μm 滤膜，上机分析。

#### 1.3.2 高分辨液质联用分析

使用 X500R LC-ESI-Q-TOF 高分辨液质联用对样品进行分离和检测。流动相由 0.1% (V/V) 的

甲酸水溶液 (A) 和乙腈 (B) 组成, 洗脱方法: 0~4.00 min 5.0% B, 4.00~6.00 min 5.0~10.0% B, 6.00~30.00 min 10.0%~40.0% B, 30.00~34.00 min 40.0%~90.0% B, 34.00~40.00 min 90% B, 40.00~42.00 min 90.0%~5.0% B, 42.00~52.00 min, 5.0% B, 流速 0.05 mL/min, 进样量 1  $\mu$ L, 柱温 40  $^{\circ}$ C; 质谱检测方法: 扫描周期 0.642 s, ESI 离子源温度 500  $^{\circ}$ C, 正离子模式, 喷雾电压 5 500 V, TOF 一级扫描范围 100~1 200 Da, 二级扫描范围 50~1 200 Da, 工作模式 IDA, 最大候选离子数 4, 开启动态排除, 其余参数使用蛋白质组学方法默认值。

### 1.3.3 多肽组学鉴定分析

使用 ProteoWizard 3.0<sup>[16]</sup> (美国 ProteoWizard 公司) 对样品所采集的质谱数据 (wiff2) 进行格式转换 (Mgf), 再采用 PepOS 2.0.3 (广东五邑大学) 对样品进行鉴定分析, 参数设置为一级母离子误差 20 ppm, 二级子离子误差 0.02 Da, 鉴定离子簇类型为 a、b 和 y 离子簇, 其中 Exhaust 引擎的参数设置为多肽长度 2~6, Search 引擎的参数设置为多肽长度 2~10, FDR 1%。蛋白序列库下载自 UniProt<sup>[17]</sup> (<https://www.uniprot.org/>, 关键词 “casein”、“collagen”、“soybean” 和 “collagen”, 2023 年 11 月 16 日)。

### 1.3.4 多肽组学分析应用对比

采用 Proteome Discoverer 2.4<sup>[18]</sup> (配备 SEQUEST 引擎, 美国 Thermo 公司)、SearchGUI<sup>[19]</sup> (配备 MyriMatch 和 X! Tandem 引擎, 比利时 Ghent 大学) 与 PepOS 2.0.3 (广东五邑大学) 分别进行多肽鉴定处理和分析对比。其中, Proteome Discoverer 2.4 多肽长度设置 4~25, SearchGUI 多肽长度设置为 2~25, FDR 1%, 其余参数同 PepOS 或使用默认设置。

### 1.3.5 多肽鉴定效果评价

为便于对多肽鉴定效果进行准确率评价, 分别计算鉴定结果准确率 (Accuracy rate,  $A_r$ ) 和多肽准确检出率 (Recall rate,  $R_r$ ) 如下:

$$A_r = \frac{N_i}{N_t} \times 100\% \quad (1)$$

$$R_r = \frac{N_a}{N_k} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

$N_i$ ——多肽鉴定数量;

$N_t$ ——多肽鉴定总数量;

$N_a$ ——多肽准确检出数量;

$N_k$ ——混标中已知多肽数量。

### 1.3.6 多肽活性匹配与统计

勾选 PepOS 2.0.3 Data Base Match analysis 选项, 使用内置活性肽数据库对鉴定结果进行活性匹配和统计。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Exhaust引擎在短肽分析中的应用

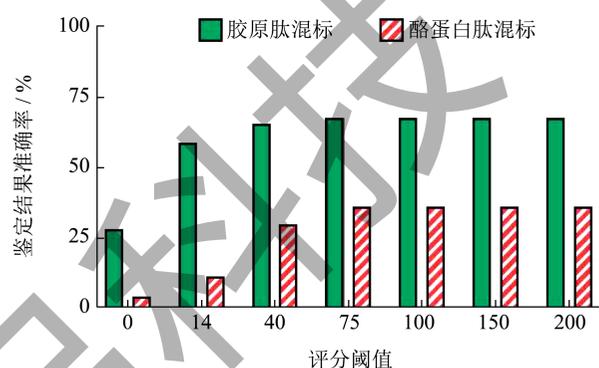


图 1 Exhaust 在混合标准品中多肽鉴定的应用评价

Fig.1 Application of the Exhaust engine in identifying peptides from the standard mixtures

注: 残基检出率阈值设置为 0。

Exhaust 是 PepOSX 工作站利用枚举法设计的一种解谱引擎, 其解谱过程可不依赖于数据库并对鉴定结果进行独立 IonsEva 打分<sup>[12]</sup>, 因而特别适用于食源性短肽的解谱和结构鉴定。采用 Exhaust 引擎在不同 IonsEva 评分阈值下对胶原肽和酪蛋白肽混合标准品进行鉴定, 鉴定结果准确率的变化情况如图 1 所示。由图 1 可知, 随着评分阈值的增加, 鉴定结果准确率迅速上升, 并在分值超过 75 之后趋于稳定, 分别达到 67.86% 和 36.36%。分析二者之间差异的主要原因在于酪蛋白肽混标中含有较多长度超过 6 的长肽, Exhaust 解谱范围未能覆盖长肽范围, 导致鉴定结果准确率偏低。取评分阈值为 75 时的鉴定结果计算短肽准确检出率, 分别达到 80% 和 100%, 反映引擎具有极优的未知多肽探索能力。与此同时, 短肽准确检出率较高, 而鉴定结果准确率偏低, 亦说明质谱数据中可能存在部分冗余谱图, 导致冗余鉴定, 这些冗余鉴定结果一方面可能源自质谱污染或残留物, 另一方面可能与已知多肽在溶液中的降解有关。本实验表明合理的评分阈值对于保障 Exhaust 引擎的准确率具有重要意义, 同时亦

充分展示了 Exhaust 在发现和鉴定未知多肽中的突出潜力。

## 2.2 Search引擎在已知蛋白源样品分析中的应用

Search 是 PepOSX 工作站基于序列搜库方法构建的一种解谱引擎,旨在利用相对概率打分(BMS)设计消除长度歧视,可用于库依赖性全长度多肽的解谱<sup>[13]</sup>。在不同评分阈值下,两种多肽混合标准品的鉴定结果准确率变化情况如图 2 所示。由图可知,评分阈值为 0 时,胶原蛋白和酪蛋白肽混标鉴定结果准确率仅分别为 37.10% 和 22.22%,而随着评分阈值的增加,鉴定结果准确率迅速上升,并在阈值分别达到 75 和 50 后趋于稳定,分别达到 71.43% 和 90.48%。同时,取评分阈值 75 时的鉴定结果进一步计算胶原肽和酪蛋白肽混标的多肽准确检出率分别高达 91.30% 和 100%,这充分体现了 Search 引擎在库依赖性多肽鉴定中的突出优越性、准确性及实用性,同时也再次说明了打分评价机制在多肽鉴定结果筛选中的重要性。

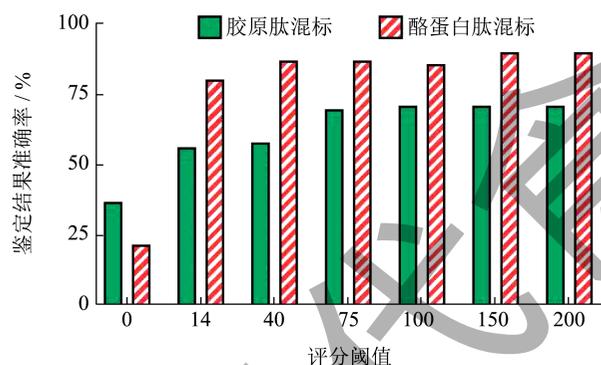


图 2 Search 引擎在混合标准品中多肽鉴定的应用评价  
Fig.2 Evaluation of Search engine in identifying peptides from the standard mixtures

注:残基检出率阈值设置为 0。

## 2.3 双引擎联用在样品分析中的应用

### 2.3.1 双引擎联用在混合标准品分析中的应用评价

综上所述,Exhaust 和 Search 引擎具有不同的肽组学解谱适用性,在复杂样品体系的分析应用中,二者联用可有助于改善解谱效果。图 3a 为双引擎联用在两种混合标准品中的应用情况,由图可知,设置相对概率打分阈值 75 可有效区分正确和错误的鉴定结果,提升鉴定结果准确率和有效性。进一步探究残基检出率阈值(指多肽候选序列中残基检出数量与所有残基数量的百分比值)对鉴定结果准确

率的影响如图 3b 所示。图中,随着残基检出率阈值的不断增加,鉴定结果准确率迅速提升,在阈值达到 80% 以后,逐渐趋于平缓,达到 71.43% 和 86.96%。这一方面说明残基检出率阈值的优化可明显改善多肽鉴定效果,进而提升鉴定结果准确率。另一方面,变化残基检出率阈值与前述 BMS 评分阈值所得鉴定结果准确率的变化趋势相似,这间接反映二者之间的一定关联性,残基检出率阈值增加,对应候选结果的可信度和评分值也相应增大,利用这种协同作用机制可有效提高谱图鉴定效果。

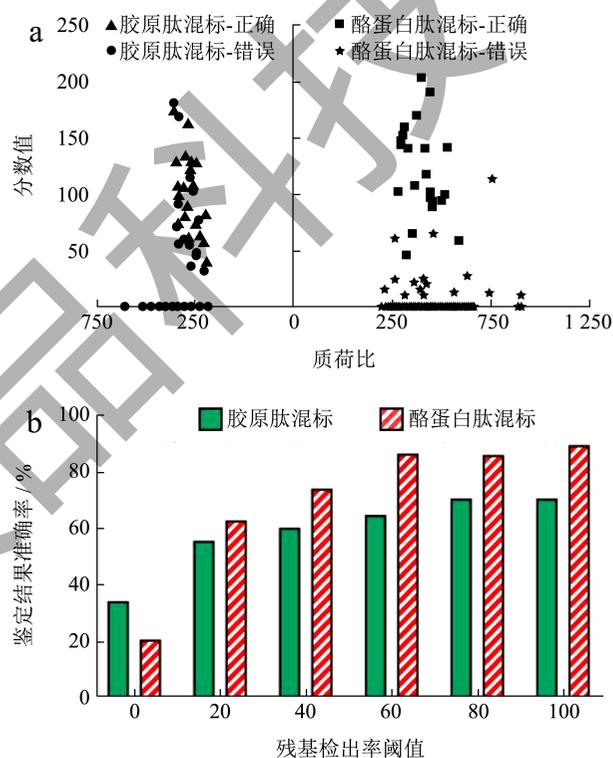


图 3 双引擎联用在混合标准品分析中的应用评价

Fig.3 The combined application and evaluation of the dual engines in identifying peptides from the standard mixtures

注:图 a 的残基检出率阈值设置为 0,图 b 的评分阈值设置为 0。

### 2.3.2 双引擎联用在实际样本分析中的应用

基于前述优化的解谱工作参数,将 PepOSX 双引擎联动用于食源性蛋白酶解产物的多肽组学分析,结果如图 4a 所示。由图可知,软件在不同样品中的多肽鉴定量存在较大差异,分析原因这主要与样品在高分辨液质中的谱图采集情况有关,这也反映了高效色谱分离和质谱检测方法在多肽组学分析中的重要性<sup>[20]</sup>。本次分析中,玉米蛋白酶解物解谱效果最好,尽管相关数据采集自微升级质谱,但

仍鉴定了谱图 1 332 张, 反映软件在实际样本分析中的应用能力与巨大发展潜力。进一步统计和分析酶解产物中已鉴定多肽的长度分布、等电点分布和疏水性分布如图 4b~4d 所示。由图 4b 可知, 各酶解产物的多肽组成主要以 2~5 肽为主, 同时含有部分长肽, 这一分析结果与食源性蛋白质酶解产物的加工特点相一致。因普遍使用粗酶及广谱性酶制剂, 食源性蛋白质在酶解过程中常产生大量的非特异性多肽, 尤以短肽居多<sup>[21]</sup>。图 4c 表明多肽的等电点集中在 3 和 5, 说明酶解产物在酸性食品体系中的应用仍将受到一定限制, 可能出现多肽沉淀, 但在中性和弱碱性食品应用中将较为稳定。图 4d 反映多肽的疏水性分布主要集中于 -1.5~1 范围内, 具有良好的亲水性, 在水相食品体系中具有较好的应用前景。

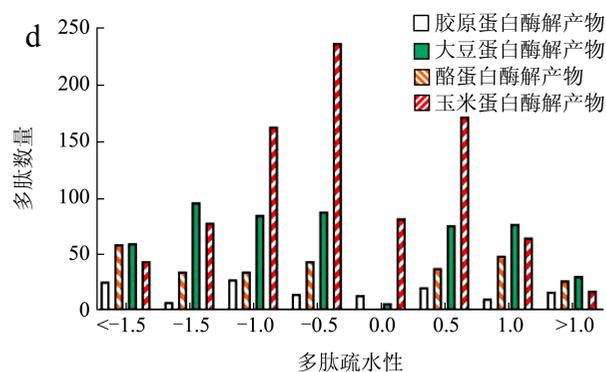
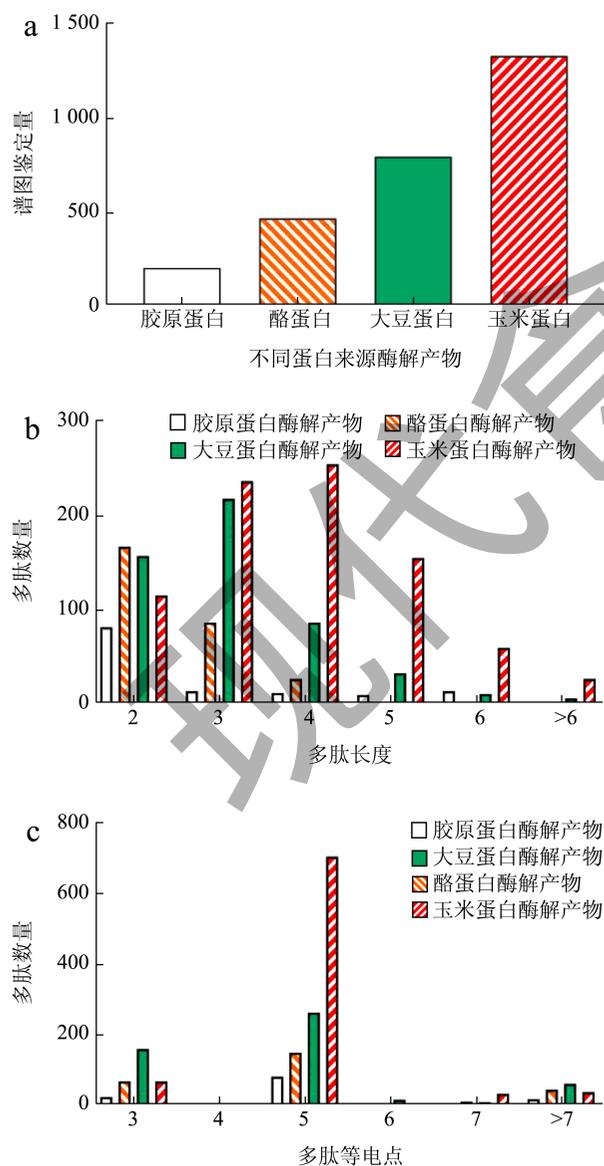


图 4 PepOSX 双引擎联用在食源性蛋白质酶解产物鉴定分析中的应用

Fig.4 Application of the PepOSX with dual engines enabled in analyzing food-derived protein hydrolysates

### 2.3.3 酶解产物中多肽的活性匹配与分析

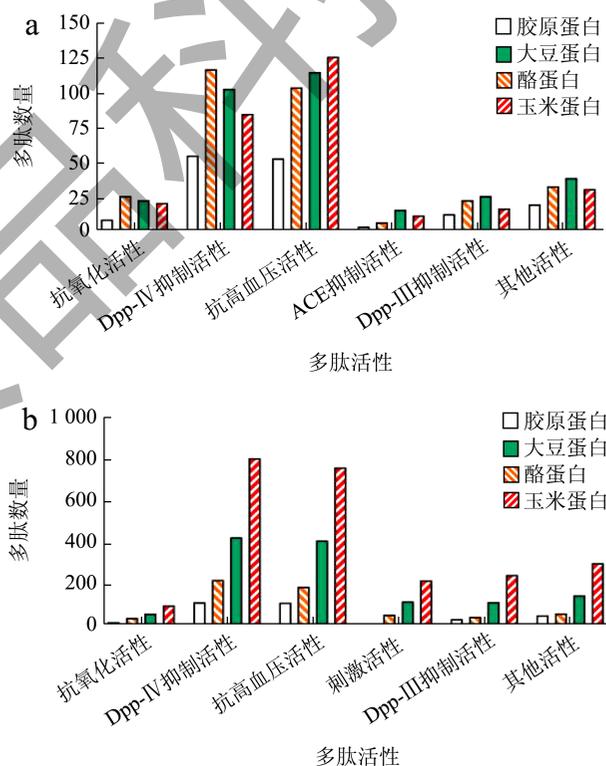


图 5 不同蛋白来源酶解产物中多肽的活性分析

Fig.5 Activity analysis of peptides identified from from different protein hydrolysates

PepOSX 通过查阅文献和数据整理, 构建了本地活性肽数据库 PepDBX, 以用于活性肽的活性匹配与分析, 目前数据库已收录 51 种活性肽, 并仍在不断发展和完善。利用内置数据库对酶解产物中的多肽进行活性分析, 结果如图 5 所示。图 5 中, 完全匹配指多肽与已知活性肽序列完全一致, 具有相应已知报道的活性, 部分匹配指该肽段的部分子

序列与已知活性肽序列一致, 拥有已知报道活性。由图 5a 可知, 四种不同的酶解产物中均含有较多完全匹配的 DPP-IV 抑制肽、抗血压肽, 此外, 还含有较多的抗氧化肽、ACE 抑制多肽; 基于部分匹配活性分析的结果图 5b 可知, 各样品中所鉴定多肽大多含有抗氧化、抗高血压、抗菌、ACE 抑制、DPP-IV 抑制活性, 是制备以上活性多肽的潜在优质原料。这可为筛选产物中的目标活性多肽或分析多肽活性来源提供一定的理论参考, 并为充分挖掘蛋白酶解产物的营养价值、功能价值和经济价值提供一定的理论指导与实践依据。

#### 2.4 不同软件的应用效果对比与评价

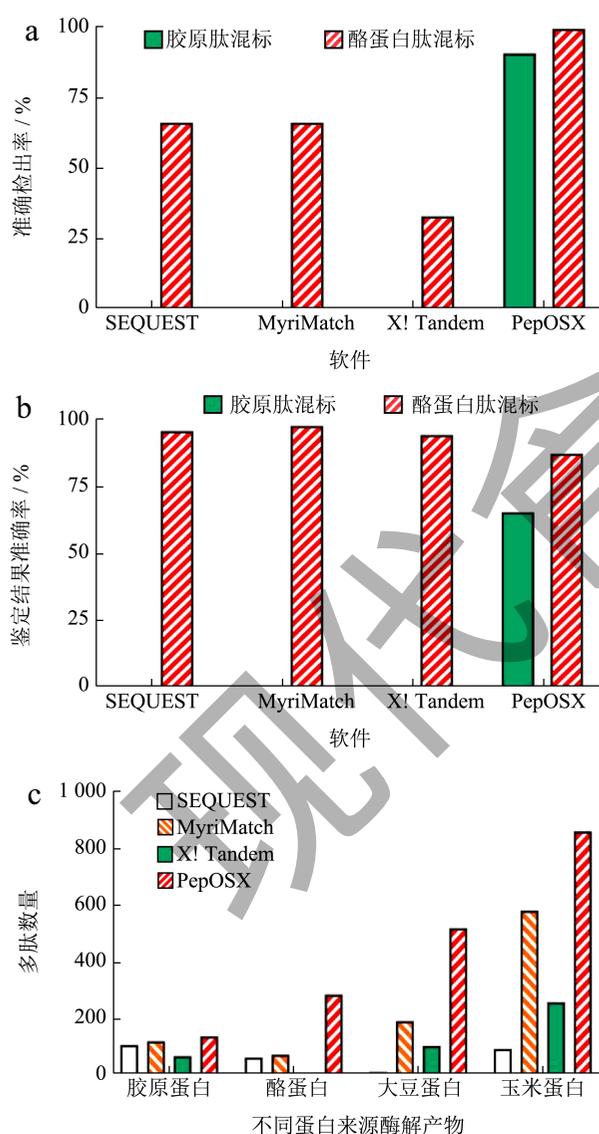


图 6 不同软件的应用效果对比与评价

Fig.6 Comparison of different softwares in peptidomic analysis

为进一步客观评价 PepOSX 在食品多肽组学分析中的应用能力与适用性, 将其与现有蛋白质

组学工具进行对比, 结果如图 6 所示。由图 6a 可知, 从多肽准确检出率来看, PepOSX 在胶原肽和酪蛋白肽混标的检出率最高, 分别高达 91.3% 和 100%, 其次为 SEQUEST 工具, 多肽准确检出率分别为 0% (胶原肽混标) 和 66.67% (酪蛋白肽混标), X! Tandem 工具的多肽准确检出率最低, 仅分别为 0% (胶原肽混标) 和 33.33% (酪蛋白肽混标)。由此可见, PepOSX 在发现和探索新型食源性多肽的能力明显优于另外三种蛋白质组学分析工具。此外, 从鉴定结果准确率来看 (图 6b), PepOSX 在胶原肽混标上的鉴定表现依旧明显优于其他三种蛋白质组学工具, 但值得注意的是, PepOSX 在酪蛋白肽混标的鉴定结果准确率略低于其他三种工具, 推测一方面主要原因是蛋白质组学工具整体鉴定结果较少, 多肽检出率偏低, 故冗余结果较少; 另一方面, PepOSX 对谱图解谱率和检出率较高, 但同时鉴定结果冗余亦较多, 从而导致其鉴定结果准确率略下降。将四种组学分析工具应用于食源性蛋白质酶解产物的实践分析 (图 6c), 对比可知 PepOSX 软件明显优于其他三种工具, 其在酪蛋白、大豆蛋白酶解产物的解谱分析中获得了 3~4 倍于其他工具的多肽鉴定数量。这些实验充分表明了 PepOSX 软件在食源性多肽分析中的适用性、实用性与先进性, 未来对于探索食源性新活性肽或多肽释放及反应变化机制将具有重要价值。

### 3 结论

本文通过研究 PepOSX 不同鉴定方式、工作参数对已知多肽混合标准品鉴定效果的影响, 多角度评价了其在食源性多肽组学鉴定中的适用性。结果表明, PepOSX Exhaust 引擎对胶原肽和酪蛋白肽混标的短肽准确检出率分别高达 80% 和 100%, 对发现和探索样本中的未知短肽具有较好的适应性; PepOSX Search 引擎基于序列搜库, 对胶原肽和酪蛋白肽混标的鉴定结果准确率分别高达 71.43% 和 90.48%, 多肽准确检出率分别高达 91.30% 和 100%, 展现出对已知蛋白源酶解产物肽组学分析的优越性能。进一步将上述两种引擎联动用于混合标准品和食源性蛋白酶解产物的多肽组学分析, 并将其与 SEQUEST、MyriMatch 和 X! Tandem 三种蛋白质组学分析工具进行对比, 发现 PepOSX 的多肽准确检出率远优于其他三种工具, 在酪蛋白、大豆蛋白酶解产物的解谱分析中亦获得了 3~4 倍于其他工具的多肽鉴定数量。本文充分展示了 PepOSX 软

件在食源性多肽分析中的适用性、实用性与先进性, 将有望为探索食源性新活性肽或揭示多肽释放及反应变化机制提供有力的理论指导与技术支持。

### 参考文献

- [1] SULERIA H A, OSBORNE S, MASCI P, et al. Marine-based nutraceuticals: an innovative trend in the food and supplement industries [J]. *Marine Drugs*, 2015, 13(10): 6336-6351.
- [2] KAUR A, KEHINDE B A, SHARMA P, et al. Recently isolated food-derived antihypertensive hydrolysates and peptides: a review [J]. *Food Chemistry*, 2021, 346: 128719.
- [3] NASRI M. Chapter Four-protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. a Review [M] TOLDRÁ F N, M. *Advances in Food and Nutrition Research*, Academic Press, 2017: 109-159.
- [4] PERKINS D N, PAPPIN D J, CREASY D M, et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data [J]. *Electrophoresis*, 1999, 20(18): 3551-3567.
- [5] DIAMENT B J, NOBLE W S. Faster SEQUEST searching for peptide identification from tandem mass spectra [J]. *Journal of Proteome Research*, 2011, 10(9): 3871-3879.
- [6] SINITYCYN P, HAMZEIY H, SALINAS SOTO F, et al. MaxDIA enables library-based and library-free data-independent acquisition proteomics [J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(12): 1563-1573.
- [7] XIN L, QIAO R, CHEN X, et al. A streamlined platform for analyzing tera-scale DDA and DIA mass spectrometry data enables highly sensitive immunopeptidomics [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 3108.
- [8] AMBLI M, DERACINOIS B, JENEQUIN A S, et al. Impact of bioinformatics search parameters for peptides' identification and their post-translational modifications: a case study of proteolysed gelatines from beef, pork, and fish [J]. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2023, 12(13): 2524.
- [9] 范丽琪, 郁晓艺, 刘磊, 等. 肽组学分析技术及其在食品研究中的应用进展[J]. *现代食品科技*, 2023, 39: 352-359.
- [10] MARTINI S, SOLIERI L, TAGLIAZUCCHI D. Peptidomics: new trends in food science [J]. *Current Opinion in Food Science*, 2021, 39: 51-59.
- [11] DEVABHAKTUNI A, ELIAS J E. Application of de novo sequencing to large-scale complex proteomics data sets [J]. *Journal of Proteome Research*, 2016, 15(3): 732-742.
- [12] 徐巨才, 黄峻洪, 陈雅君, 等. 一种基于多肽长度的短肽组学鉴定方法及其应用: 中国, ZL.202210151752.2[P]. 2022.
- [13] 徐巨才, 刘万顺, 陈雅君, 等. 一种基于贝叶斯评价和序列搜库的多肽组学鉴定方法及其应用: 中国, ZL.202210150460.7[P]. 2022.
- [14] 徐巨才, 刘万顺, 陈雅君, 等. PepOS多肽组学综合分析软件(Version1.0)[CP]. 江门: 五邑大学, 2022.
- [15] DALLAS D C, GUERRERO A, PARKER E A, et al. Current peptidomics: applications, purification, identification, quantification, and functional analysis [J]. *Proteomics*, 2015, 15(5-6): 1026-1038.
- [16] HOLMAN J D, TABB D L, MALLICK P. Employing proteo wizard to convert raw mass spectrometry data [J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2014, 46: 13.24.1-13.24.9.
- [17] THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2023 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(1): 523-531.
- [18] ORSBURN B C. Proteome discoverer—a community enhanced data processing suite for protein informatics [J]. *Proteomes*, 2021, 9(1): 15.
- [19] BARSNES H, VAUDEL M. SearchGUI: A highly adaptable common interface for proteomics search and de novo engines [J]. *Journal of Proteome Research*, 2018, 17(7): 2552-2555.
- [20] LI W, HUANG J, ZHENG L, et al. A fast stop-flow two-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application in food-derived protein hydrolysates [J]. *Food Chemistry*, 2023, 406: 135000.
- [21] DEGROEVE S, STAES A, DE BOCK P J, et al. The effect of peptide identification search algorithms on MS2-based label-free protein quantification [J]. *Omics: A Journal of Integrative Biology*, 2012, 16(9): 443-448.