李坪灿, 于红红, 向晓黎, 等. 负载丁香酚的乳清蛋白-低酯果胶纳米乳液: 工艺优化、稳定性及抗菌活性研究 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(11): 305−314. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025080040
LI Pingcan, YU Honghong, XIANG Xiaoli, et al. Eugenol-loaded Whey Protein-Low Methoxyl Pectin Nanoemulsion: Process Optimization, Stability and Antibacterial Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(11): 305−314. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025080040

· 工艺技术 ·

负载丁香酚的乳清蛋白-低酯果胶纳米乳液: 工艺优化、稳定性及抗菌活性研究

李坪灿[1], 于红红[1], 向晓黎[2], 卢士玲[1,*]
(1.石河子大学食品学院, 肉类加工与质量控制实验室, 新疆石河子 832003;
2.新疆农垦科学院分析测试中心, 新疆石河子 832000)

摘　要: 为了解决丁香酚水溶性差、易挥发的应用局限, 本研究构建了一种基于超声辅助乳清分离蛋白-低酯果胶双层纳米乳液(Whey Protein Isolate-Low Methoxyl Pectin Bilayer Nanoemulsion, WPI-LMP BN)的新型递送系统。以平均粒径以及多分散指数(PDI)为关键评价指标, 应用 Box-Behnken 设计优化关键工艺参数(WPI 浓度、LMP 浓度、超声功率、超声时间)。通过扫描电子显微镜与傅里叶变换红外光谱解析乳液的微观形貌与分子间相互作用; 并系统评估了其在 pH、离子强度及温度胁迫下的稳定性; 最后采用琼脂扩散法比较了其与游离丁香酚的抑菌活性。结果表明, 最佳工艺参数为: WPI 浓度 2.60%、LMP 浓度 1.20%、超声功率 500 W、超声时间 8 min。此条件下制备的 WPI-LMP BN 粒径为 318.64 nm, PDI 为 0.227, 包封率达 76.53%。扫描电镜显示乳液呈球形且分布均匀, 傅里叶变换红外光谱证实成功构建了 WPI-LMP 复合界面。稳定性研究表明, 该乳液在 pH3~10、Na^+浓度≤250 mmol/L 及温度≤80 ℃ 环境下均能保持良好的物理稳定性。抗菌实验显示, WPI-LMP BN 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌圈直径相较于游离丁香酚分别显著增大了 43.11% 和 41.81%, 抑菌活性显著增强。结果表明超声辅助构建的 WPI-LMP BN 具备良好的稳定性, 可高效包封丁香酚并增强其抗菌效能, 为开发稳定、高效的植物精油抗菌剂提供了新技术路径。

关键词: 丁香酚, 超声, 蛋白-多糖体系, 纳米乳液, 响应面法, 抗菌
中图分类号: TS201.1　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2026)11−0305−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025080040
本文网刊:

Eugenol-loaded Whey Protein-Low Methoxyl Pectin Nanoemulsion: Process Optimization, Stability and Antibacterial Activity

LI Pingcan[1], YU Honghong[1], XIANG Xiaoli[2], LU Shiling[1,*]
(1.Lab. of Meat Processing and Quality Control, College of Food Science, Shihezi University, Shihezi 832003, China;
2.Analysis and Testing Center, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi 832000, China)

Abstract: To address the application limitations of eugenol due to its poor water solubility and volatility, this study developed a novel delivery system based on an ultrasound-assisted whey protein isolate-low methoxyl pectin bilayer nanoemulsion (WPI-LMP BN). Box-Behnken design was employed to optimize key parameters (WPI/LMP concentrations, ultrasound power/time), with mean particle size and polydispersity index (PDI) as critical evaluation indicators. The microscopic morphology and intermolecular interactions of the emulsion were analyzed using scanning electron microscopy and Fourier transform infrared spectroscopy; its stability under pH, ionic strength, and temperature stress was systematically evaluated; and finally, agar diffusion assays were employed to compare its antibacterial activity with that of free eugenol. The optimal conditions were established as follows: 2.60% WPI, 1.20% LMP, 500 W ultrasound power, and 8 min ultrasound time. Under

收稿日期: 2025−08−11
基金项目: 新疆生产建设兵团重点领域科技攻关计划(2025AB011); 北屯市经济技术开发区“发酵肉制品品质提升”团队引才育才项目。
作者简介: 李坪灿(1998−), 女, 硕士研究生, 研究方向: 畜产品加工与安全控制, E-mail: 1751225945@qq.com。
*** 通信作者:** 卢士玲(1976−), 女, 博士, 教授, 研究方向: 畜产品加工与安全控制, E-mail: lushiling_76@163.com。

these conditions, the resulting WPI-LMP BN exhibited a particle size of 318.6 nm, a PDI of 0.227, and an encapsulation efficiency of 76.53%. Scanning electron microscopy revealed spherical and uniformly distributed droplets, while Fourier transform infrared spectroscopy confirmed the successful formation of a WPI-LMP composite interface. Stability studies indicated that the nanoemulsion maintained good physical stability under various environmental stresses, including a broad pH range (3~10), Na^+ concentrations up to 250 mmol/L, and temperatures up to 80 ℃. Antibacterial assays showed that the inhibition zone diameters of WPI-LMP BN against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were significantly increased by 43.11% and 41.81%, respectively, compared to free eugenol, demonstrating a substantial enhancement in antimicrobial efficacy. These findings indicate that the ultrasound-assisted WPI-LMP BN possesses excellent stability, effectively encapsulates eugenol, and markedly improves its antibacterial performance, offering a promising approach for developing stable and efficient plant essential oil-based antimicrobial delivery systems.

Key words: eugenol; ultrasound; protein-polysaccharide system; nanoemulsion; response surface methodology (RSM); antibacterial

食品微生物污染是全球面临的重大健康挑战。当前广泛使用的化学防腐剂不仅可能诱导病原微生物产生多重耐药性,其潜在的毒理学风险也严重削弱了消费者对食品安全体系的信任[1−2]。植物精油因其广谱抑菌活性被视为天然抗菌剂的理想选择。其中,丁香酚已被美国食品药品监督管理局(FDA)列为“公认安全物质”(GRAS),可通过破坏病原体细胞膜结构、诱导胞内物质泄漏发挥强效抗菌作用[3−5]。然而,高挥发性、低水溶性及强烈气味严重制约了其在食品基质中的实际应用[6−7]。

纳米乳化技术是改善疏水性活性成分稳定性与生物利用度的有效策略[8]。研究表明,将精油封装为纳米乳液,不仅可有效掩盖其不良气味、降低挥发性,还能有效增强其与微生物细胞膜的相互作用,进而提升抗菌效能[9]。乳清分离蛋白(Whey Protein Isolate, WPI)是一种高效天然乳化剂,但其单独稳定的单层纳米乳液易受环境应力影响而发生聚集或分层[10−11]。相较于单层结构,多层纳米乳液通过在油滴表面构筑多重界面膜,能够更有效地防止其氧化和分解[12]。研究发现,将 WPI 与低酯果胶(Low Methoxyl Pectin, LMP)复配,可通过形成双层界面结构显著改善乳液的稳定性[13−14]。超声辅助法利用空化效应产生高强度剪切力,液体介质中气泡的快速形成、膨胀与内爆坍塌,引发局部高压冲击波,致使液滴高效崩解,因此获得的乳液相较于传统方法具有更小的液滴尺寸、更低的多分散性和更高的动力学稳定性[15−17]。该方法能瞬时产生局部高压,有效避免长时间热负荷对活性成分的破坏;同时,相较于高压均质,其还具有操作简便、能耗低和易于放大的优势。

尽管丁香酚纳米乳液的抗菌潜力已被初步证实,但针对超声辅助建立 WPI-LMP 双层载体体系的工艺缺乏系统优化,且 WPI-LMP 界面与多重环境应力下的稳定性仍有待深入探讨。因此,本研究采用超声辅助构建 WPI-LMP BN,旨在采用 Box-Behnken 响应面设计系统优化关键工艺参数(WPI 浓度、LMP 浓度、超声功率与时间),以获得具有最小粒径、低多分散性的稳定纳米乳液体系。通过 SEM 与 FT-IR 解析乳液微观形貌及分子相互作用机制,并综合评估 WPI-LMP BN 在多种环境应力(pH、离子强度、温度)下的稳定性及其对典型食源性病原菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌)的抑菌效能。预期结果将为开发高效、稳定的丁香酚递送系统提供重要的理论依据,并为天然源食品保鲜剂的开发提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 石河子大学食品学院畜产品加工与安全控制中心提供;WPI(纯度:93.1%) 恒天然商贸(上海)有限公司;LMP(纯度:99%) 新疆阜丰生物科技有限公司;丁香酚(纯度:99%)、无水乙醇、正己烷 天津福晨化学试剂厂;脑心浸出液肉汤(BHI) 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 上海力辰邦西仪器科技有限公司;JY92-IIDN 超声波细胞粉碎机 宁波新芝生物科技股份有限公司;ZS90 纳米粒度电位分析仪 英国 Malvern 公司;Nicolet IS10 傅里叶变换红外光谱(Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR)仪 美国赛默飞世尔公司;HPZ30 型场发射扫描电子显微镜(含 SU8010 台式电脑) 日本日立公司。

1.2 实验方法

1.2.1 纳米乳液的制备 参考 Wei 等[18] 的方法并适当改进。准确称取 WPI 溶于去离子水,于 25 ℃条件下以 1000 r/min 转速磁力搅拌 30 min 使其充分溶解。随后加入丁香酚,经高速剪切机处理(12000 r/min, 3 min),形成单层纳米乳液。配制 LMP 溶液作为水相,调节 LMP 水相和单层乳液的 pH 为 4,将上述 LMP 水相与单层乳液按体积比 7∶3 混合,再次以 12000 r/min 高速剪切 3 min,最终通过超声波细胞粉碎机处理,获得 WPI-LMP BN。

1.2.2 纳米乳液粒径和 PDI 测定 用 ZS90 纳米粒度电位分析仪测定 WPI-LMP BN 的平均粒径、PDI。取 1 mL 样品加入到粒度仪的样品槽中,平衡时间为 2 min,重复测定 3 次。

1.2.3　单因素实验　在系统考察工艺参数（WPI 浓度、LMP 浓度、超声功率、超声时间）之前，需首先确定丁香酚的添加量。基于食品应用的需求，预实验综合考量了乳液的抗菌效能、物理稳定性及感官接受度。结果表明，当丁香酚添加量低于 3% 时抗菌活性不足，而高于 7% 则会导致物理稳定性下降及感官品质劣变（如色泽过深、气味刺激）。因此，最终选择 5% 的添加量用于后续研究。

1.2.3.1　WPI 浓度对粒径、PDI 的影响　选取 WPI 浓度（1%、2.5%、5%、7.5%、10%），该阶段未添加 LMP，超声功率 500 W，超声时间 8 min，确定最佳 WPI 浓度。

1.2.3.2　LMP 浓度对粒径、PDI 的影响　选取 WPI 浓度 5%，LMP 浓度（0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%），超声功率 500 W，超声时间 8 min，确定最佳 LMP 浓度。

1.2.3.3　超声功率对粒径、PDI 的影响　选取 WPI 浓度 5%，LMP 浓度 1.5%，超声功率（400、450、500、550、600 W），超声时间 8 min，确定最佳超声功率。

1.2.3.4　超声时间对粒径、PDI 的影响　选取 WPI 浓度 5%，LMP 浓度 1.5%，超声功率 500 W，超声时间（2、4、6、8、10 min），确定最佳超声时间。

1.2.4　响应面优化试验　基于单因素实验结果，以乳液粒径和 PDI 为响应值，以 WPI 浓度（A）、LMP 浓度（B）、超声功率（C）、超声时间（D）为自变量因素，根据 BBD 设计响应面试验（表 1），确定 WPI-LMP BN 的最佳制备参数。

表 1　响应面试验设计因素和水平

Table 1　Response surface experimental design factors and levels

因素	水平		
	−1	0	1
A: WPI(%)	2.5	5	7.5
B: LMP(%)	1	1.5	2
C: 功率(W)	450	500	550
D: 时间(min)	6	8	10

1.2.5　包封率（Encapsulation Efficiency, EE）　参考 Zhang 等[19] 的方法并作了一些修改。所有样品均使用分光光度计在丁香酚最大吸收波长 282 nm 下进行分析。称取 100 mg 丁香酚用无水乙醇定容至 10 mL，制成 10 mg/mL 储备液，随后用无水乙醇分别制备 2、5、10、20、50、100 μg/mL 丁香酚标准溶液样品，测得不同浓度精油的吸光度值制作标准曲线。取 1 mL 乳液和 2 mL 正己烷，冰浴涡旋 10 min，随后在 4 ℃ 下离心 20 min（12000×g）。取上层有机相，用无水乙醇适当稀释后记录吸光度值用于计算游离丁香酚，稀释倍数以确保其吸光度值落在标准曲线线性范围内为准。取 0.2 mL 乳液和 0.8 mL 10% SDS 溶液，涡旋 10 min 后加无水乙醇定容至适当体积，振荡后离心，取上清液，记录吸光度值用于计算丁香酚总量，同样，稀释倍数需确保吸光度值在线性范围内。根据下式计算 EE：

$$EE(\%) = \left(1 - \frac{C_f}{C_t}\right) \times 100$$

式中：C_f 表示游离丁香酚浓度（μg/mL），其值为从游离丁香酚样品吸光度计算出的浓度乘以其稀释倍数；C_t 表示丁香酚总浓度（μg/mL），其值为从总丁香酚样品吸光度计算出的浓度乘以其稀释倍数；在实际测定中，为保障所有吸光度读数均处于标准曲线最佳线性范围内，不同样品根据其实际浓度进行了相应稀释。

1.2.6　扫描电子显微镜和傅里叶变换红外光谱分析　取少量 WPI-LMP BN 放置于用导电胶带固定好的硅片上晾干，再进行喷金使之具有导电性。将准备好的样品放入扫描电子显微镜中观察其微观结构。采用溴化钾压片法测定红外光谱吸收曲线。将 WPI 溶液、丁香酚单层纳米乳液、WPI-LMP BN 进行冷冻干燥处理，分别与溴化钾按 1∶100 质量比（2 mg/200 mg）混合，研磨 5 min 后于 20 MPa 压力下压片 40 s，获得 1 mm 厚透明薄片，使用 FT-IR 光谱仪在 4000~400 cm^{-1} 范围以 2 cm^{-1} 分辨率扫描。

1.2.7　稳定性分析

1.2.7.1　热稳定性　取 10 mL 丁香酚单层纳米乳液、WPI-LMP BN 置于试管中，分别于 40~90 ℃ 温度梯度下避光恒温处理 1 h。冷却后立即测定粒径、PDI。

1.2.7.2　金属离子稳定性　用 100~300 mmol/L NaCl 溶液将丁香酚单层纳米乳液、WPI-LMP BN 稀释 100 倍，4 ℃ 避光贮存 1 h 后测定粒径、PDI。

1.2.7.3　酸碱稳定性　分别取 15 mL 丁香酚单层纳米乳液、WPI-LMP BN 加入到 50 mL 离心管中，用 1 mol/L 的 HCl 或者 1 mol/L 的 NaOH 将乳液 pH 调整为 2.0~10.0 梯度，在 4 ℃ 下保存 1 h 后立即取样，测定其粒径、PDI。

1.2.8　抑菌性能　参考 Moussaoui 等[20] 的改良方法来确定 WPI-LMP BN 对供试菌的抗菌活性。首先，在 BHI 固体培养基上接种 200 μL 细菌悬浮液（10^6/CFU），并在培养基表面放置无菌纸盘。然后，分别将 25 μL 生理盐水、WPI-LMP 混合液、WPI-LMP BN 以及与其含量相等的丁香酚浸渍到圆盘上。在 37 ℃ 下培养 24 h 后，采用十字交叉法测量圆盘周围抑制圈的直径，测定结果取三次平均值。

1.3　数据处理

每组实验平行测定三次，数据以均值±标准差表示。采用 Excel 2016 进行基础数据处理，Origin 2022 完成图表可视化，并通过 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析（One-way ANOVA）进行显著性分析。采用 Design-Expert 13.0 软件进行响应面试验设计与数据分析。

2 结果与分析

2.1 WPI 浓度、LMP 浓度、超声功率、超声时间对 WPI-LMP BN 粒径及 PDI 的影响

粒径及其分布是评价乳液稳定性的关键指标。较小的粒径可通过减弱布朗运动抑制液滴聚集,从而提升体系稳定性;而较低 PDI 则反映液滴尺寸均一性,PDI 值趋近 0 表明分散均匀度更高[21]。乳化剂浓度对纳米乳液稳定性具有决定性影响[22]。

如图 1a 所示,随着 WPI 浓度升高,单层乳液粒径及 PDI 呈下降趋势,在 5% 时趋于稳定(粒径 218 nm, PDI 0.269)。该现象归因于低浓度的 WPI 对油滴界面包覆不足,部分油脂无法均匀分散而导致粒径增大;当浓度增至 5% 时,WPI 分子在油水界面形成饱和吸附层,通过抑制絮凝实现粒径最小化[23]。Yin 等[24] 也报道了类似的趋势。而随着浓度继续升高,粒径和 PDI 也逐渐增大,这可能归因于较高的 WPI 浓度导致体系黏度和界面饱和度的增加,从而限制了超声诱导的分散效率[25]。故选择 WPI 浓度 5% 作为后续响应面试验的中心水平。

由图 1b 可知,低浓度 LMP 的乳液体系具有较高的液滴尺寸和 PDI,这是因为 LMP 层覆盖不足导致静电斥力减弱,引发液滴絮凝,当浓度增至 1.5% 后,LMP 完整包覆 WPI 层,通过增强静电稳定机制有效阻止聚集[26]。而较高浓度的 LMP 减弱了超声波传播,促进了更高的聚结率[27]。因此选定 LMP 浓度 1.5% 作为后续研究的中心水平。

超声作为高能乳化技术,可制备小粒径、高稳定纳米乳液[28]。图 1c 表明,当超声功率从 400 W 提升至 500 W 时,粒径由 364.57±5.82 nm 显著减小至 316.37±4.84 nm(P<0.05)。Jara-Quijada 等 [29] 指出,这一变化趋势与超声引起的空化效应一致,超声波能够有效破碎液滴并重组乳化基质。同时,PDI 在 500 W 时达到最低值(0.224±0.006),这反映了更均匀的尺寸分布。当超声功率继续增大时,粒径和 PDI 也随之增大,这是因为过大的超声功率会使空化气泡变得过大难以破裂,同时过量气泡聚集在换能器端面形成“屏蔽层”,阻碍声波向远处传播,从而导致空化效应降低,进而形成粒径分布不均匀的液滴[30−31]。鉴于 500 W 时乳液粒径最小且分散均一性最优,故将其确定为最佳功率水平。

图 1d 观察到随着超声时长的增加,乳液的液滴大小和 PDI 显著下降(P<0.05),这主要是因为在一定超声功率下,更长的处理时间意味着向体系中输入的总能量更高,从而使液滴的破碎更充分,该结果与 Sharma 等[30] 之前的报道一致。当超声时长达 8 min 时,粒径和 PDI 指数呈最小值,该现象是由于适度超声通过空化效应充分破碎液滴,而过度处理则诱发液滴碰撞重组,导致 PDI 回升[32]。

2.2 纳米乳液制备条件响应面优化研究

2.2.1 纳米乳液制备条件响应面优化试验方案及结果 根据单因素实验结果,采用四因素三水平响应面试验对 WPI-LMP BN 制备条件进行优化。选择 WPI 浓度、LMP 浓度、超声功率、超声时间作为因素,设计了 29 组试验,包括 5 次重复,以 WPI-LMP BN 粒

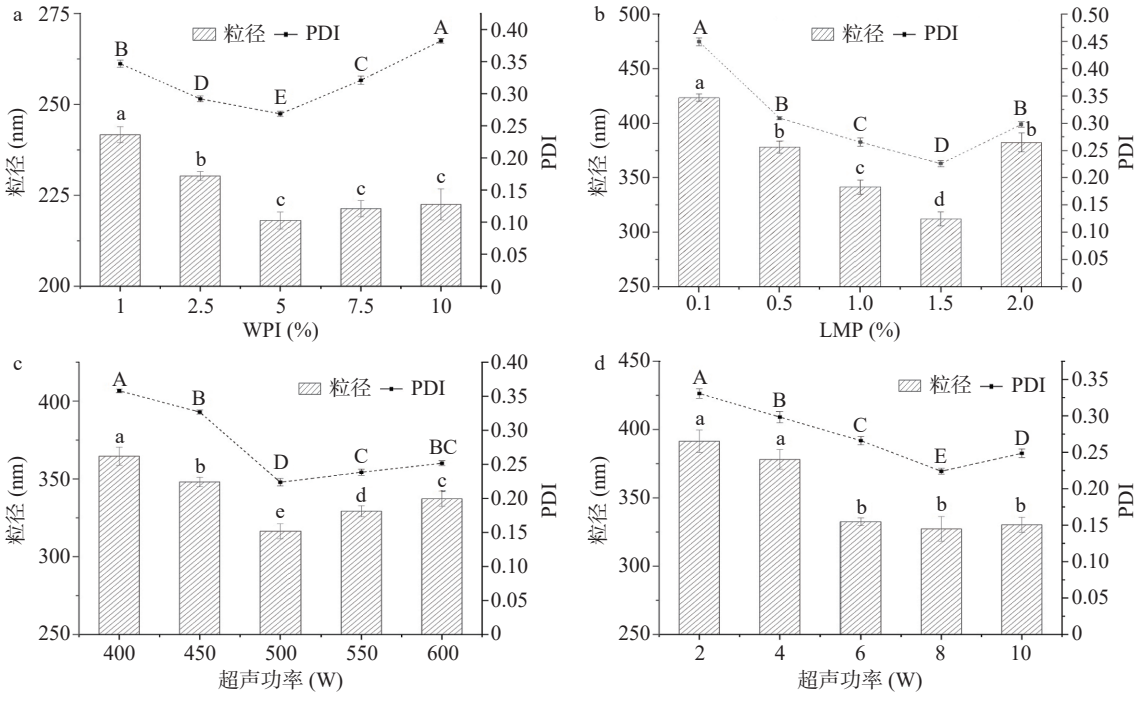


图 1 不同制备条件对 WPI-LMP BN 粒径及 PDI 的影响

Fig.1 Effect of different preparation conditions on particle size and PDI of WPI-LMP BN

注:不同小写字母表示粒径组间差异显著(P<0.05);不同大写字母表示 PDI 组间差异显著(P<0.05);图中连线仅用于辅助显示 PDI 的变化趋势,而非表示连续的函数关系;图 1a 为仅由 WPI 制备的单层乳液。

径及 PDI 为响应变量，确定最优化制备工艺并验证（表 2）。

表 2　Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2　Box-Behnken experimental design and results

试验号	A: WPI	B: LMP	C: 功率	D: 时间	粒径(nm)	PDI
1	0	0	−1	1	369.45	0.347
2	1	1	0	0	384.25	0.381
3	0	1	1	0	355.45	0.342
4	0	0	−1	−1	382.5	0.389
5	−1	0	0	1	315.55	0.265
6	−1	0	1	0	338	0.304
7	1	0	0	1	354.85	0.369
8	−1	1	0	0	342.6	0.318
9	0	−1	−1	0	357.05	0.365
10	−1	0	0	−1	331.55	0.269
11	−1	−1	0	0	314.3	0.235
12	0	0	0	0	319.1	0.236
13	0	−1	1	0	335.9	0.291
14	1	0	1	0	357.35	0.375
15	0	0	1	1	350.4	0.331
16	−1	0	−1	0	337.2	0.303
17	0	0	0	0	327.8	0.238
18	0	0	0	0	321.9	0.224
19	1	−1	0	0	361.2	0.366
20	0	0	0	0	325.2	0.233
21	0	1	0	−1	365.7	0.342
22	0	−1	0	1	322.15	0.298
23	0	−1	0	−1	358.35	0.348
24	0	1	0	1	367.95	0.378
25	1	0	0	−1	382.3	0.389
26	0	0	0	0	321.4	0.228
27	1	0	−1	0	379.85	0.408
28	0	1	−1	0	372.65	0.381
29	0	0	1	−1	363.55	0.3427

2.2.2　WPI-LMP BN 制备条件的回归模型建立及方差分析　基于表 2 数据，通过多元二次回归分析构建了 WPI-LMP BN 制备工艺参数的预测模型。WPI-LMP BN 粒径和 PDI 与各因素之间的二次多元回归方程式如下：

粒径：$Y_1=323.08+20.05A+11.64B-8.17C-8.63D-1.31AB-5.83AC-2.86AD+0.9875BC+9.61BD-0.025CD+9.16A^2+13.98B^2+21.71C^2+17.33D^2$

PDI：$Y_2=0.2314+0.0496A+0.0199B-0.0173C-0.0077D-0.017AB-0.0085AC-0.004AD+0.0086BC+0.0213BD+0.0077CD+0.0431A^2+0.0509B^2+0.0675C^2+0.0538D^2$

对表 3 的方差分析结果表明，WPI-LMP BN 的粒径及 PDI 模型均达到极显著水平（$P<0.0001$），而失拟项无统计学差异，表明模型残差来源于随机误差。两个模型的拟合优度 R^2 分别为 0.9598 和 0.9783，说明所选变量可分别解释粒径 95.98% 和 PDI 97.83% 的变异，模型预测可靠性良好。

在粒径模型中，一次项系数对粒径的影响均为极显著（$P<0.01$）。交互项中 BD 的交互作用对粒径有极显著影响（$P<0.01$）。二次项中，A^2、B^2、C^2 和 D^2 对粒径均有极显著影响（$P<0.01$）。在 PDI 模型中，一次项系数对 PDI 的影响均显著，其中 A、B 和 C 极显著（$P<0.01$），D 显著（$P<0.05$）。交互项中，AB 的交互作用显著（$P<0.05$），BD 的交互作用极显著（$P<0.01$）。二次项中，所有二次项（A^2、B^2、C^2、D^2）对 PDI 均有极显著影响（$P<0.01$）。根据 F 值大小，各因素对粒径影响的显著性顺序为：A>B>D>C；对 PDI 影响的显著性顺序为：A>B>C>D。

表 3　回归模型方差分析

Table 3　Variance analysis of regression model

来源	Y_1粒径				Y_2 PDI			
	均值	F值	P值	显著性	均值	F值	P值	显著性
模型	954.86	23.9	<0.0001	**	0.0066	45.18	<0.0001	**
A-WPI	4824.03	120.73	<0.0001	**	0.0295	200.87	<0.0001	**
B-LMP	1625.18	40.67	<0.0001	**	0.0048	32.43	<0.0001	**
C-功率	801.15	20.05	0.0005	**	0.0036	24.49	0.0002	**
D-时间	894.41	22.38	0.0003	**	0.0007	4.84	0.0452	*
AB	6.89	0.1724	0.6842		0.0012	7.92	0.0138	*
AC	135.72	3.4	0.0866		0.0003	1.97	0.1823	
AD	32.78	0.8202	0.3804		0.0001	0.447	0.5146	
BC	3.9	0.0976	0.7593		0.0003	2	0.1788	
BD	369.6	9.25	0.0088	**	0.0018	12.34	0.0035	**
CD	0.0025	0.0001	0.9938		0.0002	1.62	0.2244	
A^2	544.75	13.63	0.0024	**	0.0121	82.21	<0.0001	**
B^2	1268.25	31.74	<0.0001	**	0.0168	114.41	<0.0001	**
C^2	3056.65	76.5	<0.0001	**	0.0295	201.31	<0.0001	**
D^2	1947.33	48.73	<0.0001	**	0.0188	128	<0.0001	**
失拟项	51.26	4.38	0.0838		0.0002	5.75	0.0533	
决定系数（R^2）	0.9598				0.9783			
校正系数（R_{adj}^2）	0.9197				0.9567			
精密度（Adeq）	16.4467				21.3468			

注：*$P<0.05$，表示影响显著；**$P<0.01$，表示影响极显著。

2.2.3　响应面各因素交互作用分析　响应曲面与等高线分析可用于直观评估 WPI 浓度、LMP 浓度、超声功率及时间两两交互作用对乳液粒径和 PDI 的影响。响应曲面坡度越陡或等高线越密集，表明交互效应越显著；等高线呈椭圆形则提示两因素间存在强相互作用[33]。如图 2a 所示，B 和 D 的交互图曲面坡度相对陡峭，且等高线呈椭圆分布，证实二者对 WPI-LMP BN 粒径具有显著协同影响。尽管超声空化效应可通过产生高强度剪切力，致使液滴粒径减小到纳米级[34]。但是乳液作为热力学不稳定体系，在能量足够打破原有相平衡条件下，仍然在很大程度上受乳化剂浓度调控。此外，PDI 的响应面分析（图 2b、c）同样显示 B×D 的交互作用最为显著，该结果与方差分析（表 3）结论一致。

2.2.4　WPI-LMP BN 最佳制备工艺条件及验证　通过 Design-Expert 13，按照优化目标，将 WPI-LMP BN 粒径和 PDI 设置为“minimize”，对模型方程最小化分析，得出制备 WPI-LMP BN 的最佳工艺条件为 WPI 浓度 2.60%、LMP 浓度 1.24%、超声功率

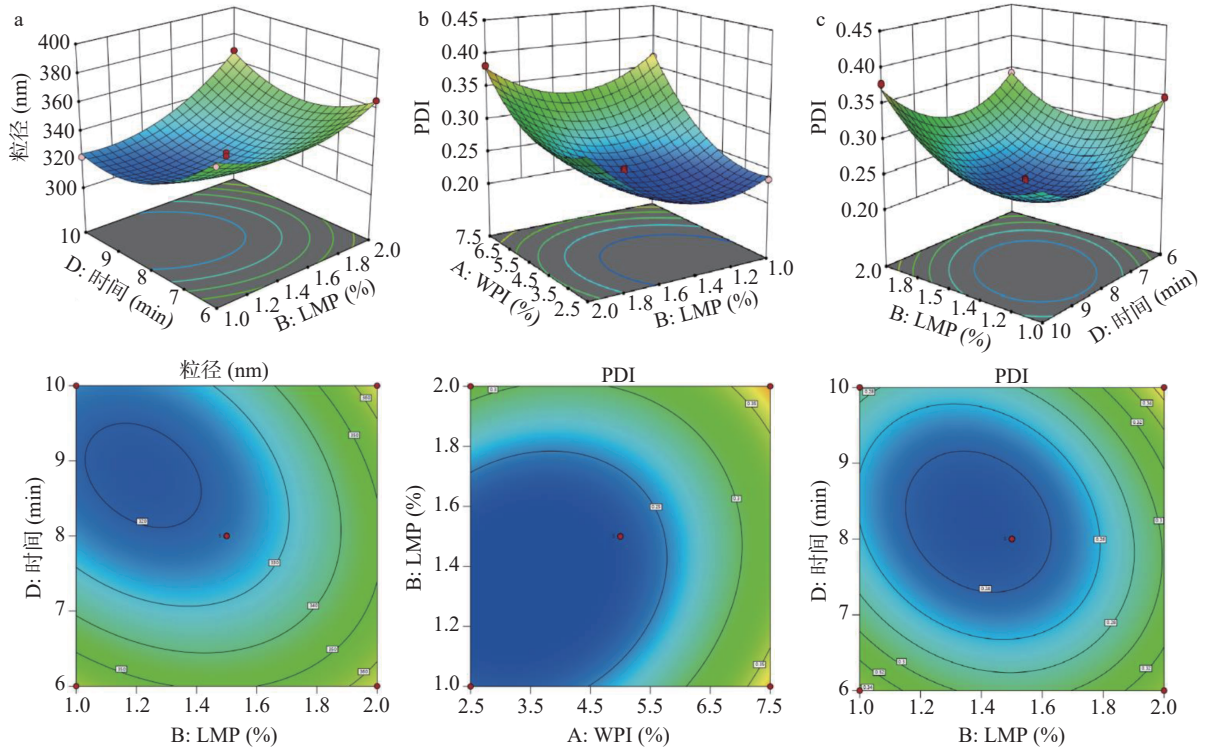


图 2　WPI-LMP BN 的粒径、PDI 的响应面与等高线图

Fig.2　Response surface and contour plots of WPI-LMP BN particle size and PDI

注: a 为 LMP 浓度与超声时间的交互作用对粒径的影响; b 为 WPI 浓度与 LMP 浓度的交互作用对 PDI 的影响; c 为 LMP 浓度与超声时间的交互作用对 PDI 的影响。

500.78 W、超声时间 7.65 min。在此条件下, 可获得粒径最小、PDI 最小的 WPI-LMP BN, 其粒径和 PDI 的理论预测值分别为 311.76 nm 和 0.222。本研究通过响应面法所得的最佳工艺参数(WPI: 2.60%, LMP: 1.24%)与单因素实验中确定的水平(WPI: 5%, LMP: 1.5%)存在差异。这主要是由于优化目标不同: 单因素实验旨在考察在其他变量固定的条件下某一变量的独立效应, 而响应面优化旨在实现粒径(Y_1)与 PDI(Y_2)的综合最优平衡。方差分析表明, WPI 与 LMP 浓度对 PDI 存在显著的交互效应(P<0.05), 且 LMP 浓度与超声时间的交互作用对粒径和 PDI 均有极显著影响(P<0.01)。这意味着 WPI 的最适浓度并非固定值, 而是高度依赖于 LMP 的浓度水平。响应面模型通过数学模型解析了这种复杂关系, 发现适度降低 WPI 和 LMP 浓度并协同配比(WPI 2.6%, LMP 1.24%), 虽相较单因素实验的'局部最优'粒径(218 nm)有所增大, 但能显著降低 PDI 至 0.222, 从而获得分布均一性更佳、综合稳定性更优的纳米乳液体系。

考虑到仪器参数设置限制等实际情况, 将制备 WPI-LMP BN 的最佳条件修正为: WPI 浓度 2.60%、LMP 浓度 1.20%、超声功率 500 W、超声时间 8 min。在上述条件下制备的 WPI-LMP BN, 其粒径和 PDI 分别为 318.64 nm 和 0.227。

2.3　包封率（Encapsulation Efficiency，EE）

根据丁香酚浓度以及所测得的吸光度绘制出标准曲线(图 3a)。经分析计算得出回归方程为 y=0.0096x-0.0069, R^2=0.9997。如图 3b 所示, 测得单层 WPI 乳液的 EE 为 64.36%, 而 WPI-LMP BN 的 EE 为 76.53%, 比单层 WPI 乳液提高了 12.17%。这一结果表明, WPI-LMP 双层结构通过形成更致密的

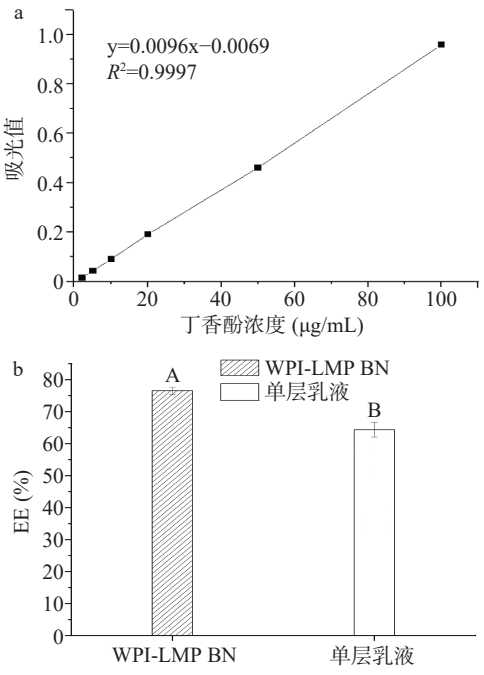


图 3　丁香酚标准曲线及乳液包封率

Fig.3　Eugenol standard curve and nanoemulsion encapsulation rate

注: 图中不同大写字母表示组间差异显著(P<0.05)。

界面膜，能更有效地包封丁香酚，减少其泄漏和挥发。一个完整、致密的界面层不仅能提高封装效率，同时也是增强乳液对抗环境应力（如 pH、离子、温度）能力的结构基础[23]。因此，WPI-LMP BN 对丁香酚的这种强效包封与保护作用，有助于其在加工和储存过程中保持活性化合物的完整性和有效性[35]。类似地，Ma 等[36] 和 Wang 等[37] 分别报告了大豆分离蛋白和柑橘果胶的共价结合物负载 β-胡萝卜素的和辛烯基琥珀酸酐改性淀粉负载槲皮素的递送体系也实现了高包封率，并强调了这种复合结构对稳定性的贡献。

2.4　扫描电子显微镜及傅里叶变换红外光谱分析

图 4a 显示了 WPI-LMP BN 的扫描电子显微镜图像，可以观察到均匀分散的球形液滴结构，该形貌特征与 de Souza 等[38] 及 Huang 等[39] 报道的纳米乳液微观形态一致。纳米乳液颗粒呈现球形，这是由较高的界面张力（γ）和较小的颗粒半径（r）共同决定的。根据拉普拉斯压力公式（ΔP=2γ/r），界面张力越高、半径越小，液滴受到的向内压力越大，从而趋向于形成表面积最小的球形结构，以维持体系稳定[40]。

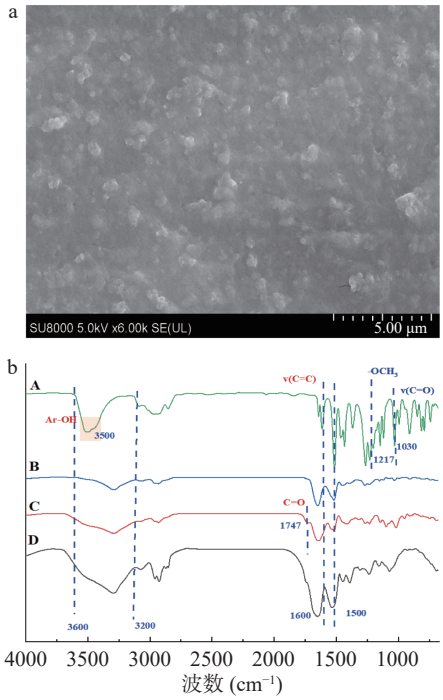


图 4　WPI-LMP BN 的微观形貌与化学结构表征

Fig.4　Microscopic morphology and chemical structure characterization of WPI-LMP BN

注：a 扫描电子显微镜；b 傅里叶变换红外光谱结果，其中，A 为丁香酚，B 为 WPI 单层乳液，C 为 WPI-LMP BN，D 为 WPI 纯品。

通过对傅里叶变换红外光谱的系统分析（图 4b），可以证实丁香酚被成功包埋于 WPI-LMP 形成的复合体系中。首先，丁香酚的特征峰（芳香环 C=C）在包埋后伸缩振动峰（1600~1500 cm^{-1}）强度显著减弱，尤其在 WPI-LMP BN 中减弱最为明显，说明苯环结构被有效包裹。其次，在 WPI-LMP BN 样品中，新增的 1747 cm^{-1} 吸收峰对应 LMP 的羧酸基团（C=O）振动[41]，而该峰在 WPI 单层乳液光谱中并不存在，证明了 WPI-LMP BN 外层 LMP 的成功包覆。所有含 WPI 的样品在氢键相互作用区（3200~3600 cm^{-1}）的区域内均呈现宽吸收峰。与纯 WPI 相比，WPI 单层乳液此处峰强降低，表明乳化过程破坏了蛋白质内部的氢键网络[42]；而 WPI-LMP BN 的吸收峰强度有所回升且进一步展宽，这证明了 LMP 的引入不仅成功包覆，更与内核 WPI 和丁香酚形成了全新的、更复杂的氢键网络，这是稳定双层结构并实现高效包封的分子基础[43]。

2.5　纳米乳液稳定性分析

2.5.1　热稳定性测试　图 5a 和图 5b 显示，WPI 单层乳液与 WPI-LMP BN 乳液表现出明显不同的热稳定性。随着温度升高，单层乳液的粒径和 PDI 逐渐增大，这表明其稳定性显著下降，这是因为液滴表面吸附的球状蛋白的热变性和展开，导致非极性和巯基暴露，从而增加蛋白-蛋白间相互作用，从而发生液滴聚集[44]。然而 Lee 等[45] 和 Teo 等[46] 之前的结果显示 WPI 制备的纳米乳液在热处理中是稳定的。这是由于他们的研究中使用的加热持续时间较短，均为 15 min。Sliwinski 等[47] 报道了乳液中乳清蛋白的聚集取决于加热时间。而 WPI-LMP BN 在 40~80 ℃ 区间保持良好稳定性，粒径与 PDI 未发生显著变化，这是因为外层 LMP 膜通过空间位阻和静电斥力作用，有效削弱了高温对内部 WPI 层的影响。

2.5.2　离子稳定性　从图 5c 和图 5d 中观察到 Na^+ 浓度越高，单层纳米乳液的液滴尺寸越大，这是由于离子屏蔽了液滴表面的负电荷，削弱了排斥力，疏水相互作用和范德华力占据主导，从而引发了液滴聚集[48]。而在 100~300 mmol/L 的 Na^+浓度变化范围内，WPI-LMP BN 粒径和 PDI 分别增长约 18%、32%，相较于同 Na^+浓度的单层乳液保持了相对稳定。这源于 WPI-LMP 形成较厚的界面膜，提高了对静电屏蔽作用的抵抗力。有研究表明，多糖可以在乳化剂涂层的油滴周围形成保护涂层，有效抑制蛋白质基纳米乳液在高离子强度环境中的聚集行为，从而提升体系稳定性[49-50]。

2.5.3　酸碱稳定性　研究系统评估了 WPI-LMP BN 与 WPI 单层纳米乳液在 pH2.0~10.0 范围内的稳定性，结果如图 5e 和图 5f 所示。WPI-LMP BN 展现出优异的宽 pH 稳定性。在 pH2~10 的广泛范围内，其粒径与 PDI 虽有一定波动，但始终保持在较低水平（粒径<400 nm，PDI<0.3），未发生聚集或失稳现象。与之相比，WPI 单层纳米乳液的稳定性严重依赖于环境 pH，在 pH5.0 时液滴尺寸和 PDI 分别增至 905.5 nm、0.86。这是由于 WPI 的等电点（pI）在 4.9 左右，蛋白质周围的静电排斥力降低，导致液滴聚集[51]。而 WPI-LMP BN 的粒径和 PDI 虽然在 pH 为 2~3 的范围内有所增加，但仍旧保持在较低水平，是由于 LMP 在低 pH 条件下因羧基质子化呈电中

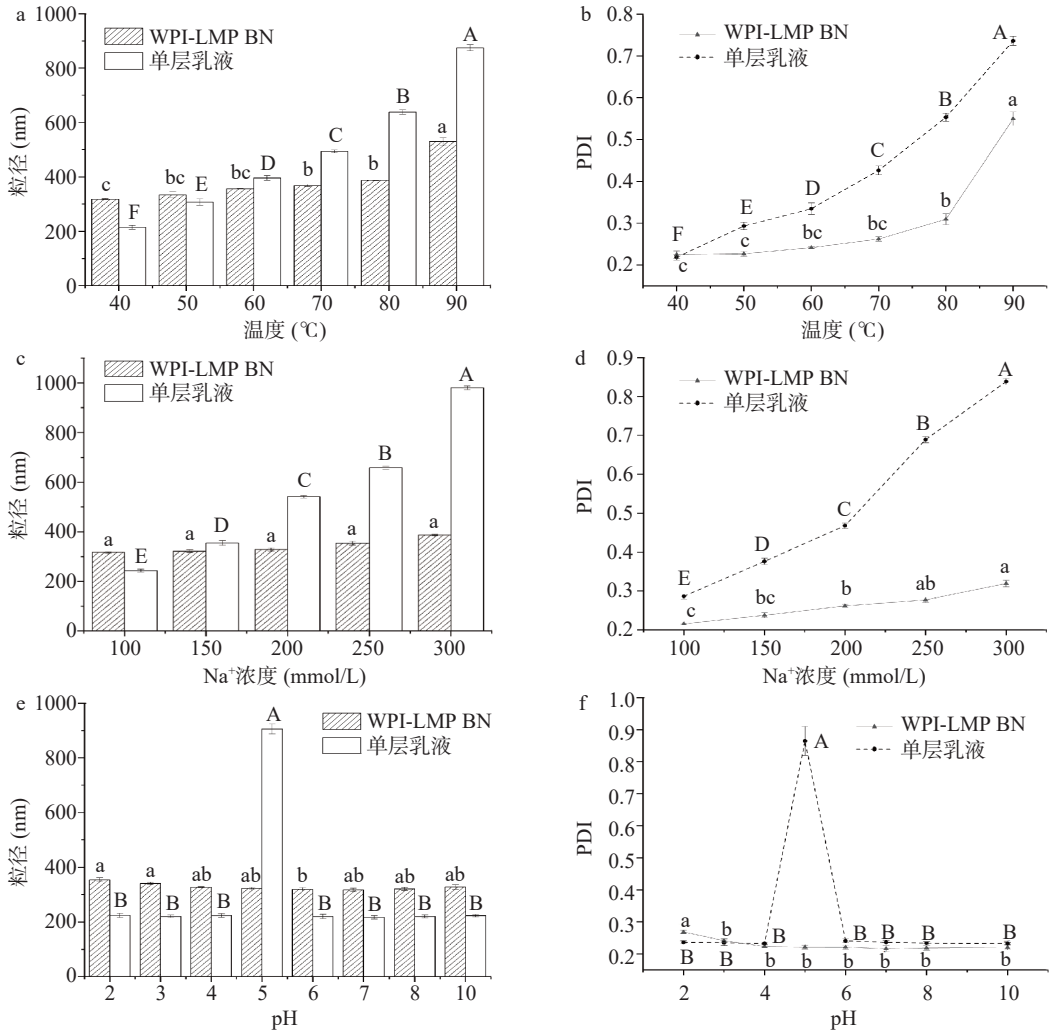


图 5　不同条件下 WPI 单层乳液和 WPI-LMP BN 粒径、PDI 的变化

Fig.5　Changes of particle size and PDI of WPI monolayer lotion and WPI-LMP BN under different conditions

注: 图中不同大写字母表示单层乳液间差异显著, 不同小写字母表示 WPI-LMP BN 间差异显著(P<0.05)。

性, 通过分子间氢键及范德华力构建致密物理交联网络, 并与带正电的 WPI 通过离子偶极-氢键协同作用形成稳定复合界面, 从而维持了体系的稳定性[13]。而后随着 pH 升高, 粒径和 PDI 趋于稳定, 是因为蛋白质-多糖复合体系的稳定性提升机制, 即多糖可在乳化剂外层形成保护性涂层, 通过增强空间位阻与静电斥力维持体系稳定[52]。

2.6　WPI-LMP BN 的抑菌活性

通过琼脂扩散法对比了 WPI-LMP BN 和丁香酚的抑菌效能(图 6)并将抑菌圈直径记录在表 4 中。结果表明, 两者对供试菌均有抑制作用。WPI-LMP BN 的抑菌圈直径显著大于丁香酚(P<0.05), 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的抑菌圈直径分别增大 43.11% 和 41.81%。该现象与 Li 等[23] 报道的百里香精油纳米乳液增效规律一致, 即纳米化通过增强疏水性活性成分的水溶性及细菌接触效率, 从而使其抑菌圈直径显著增大, 反映出其抗菌效能的提升。

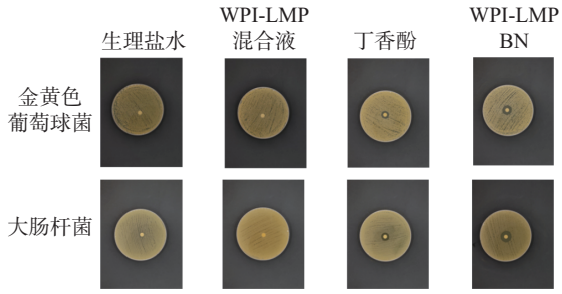


图 6　WPI-LMP BN 和丁香酚对供试菌的抑制圈

Fig.6　Inhibition zones ofWPI-LMP BN and eugenol on the tested bacteria

表 4　WPI-LMP BN 和丁香酚对供试菌的抑制圈直径

Table 4　Inhibition zone diameter of WPI-LMP BN and eugenol on the tested bacteria

抑菌剂类型	抑制圈直径(mm)	
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
丁香酚	11.04±0.48^{b}	12.15±0.22^{b}
WPI-LMP BN	15.80±0.32^{a}	17.23±0.16^{a}

注: 同一列不同小写字母表示同一供试菌不同抑菌剂类型之间存在显著性差异(P<0.05)。

3　结论

采用单因素结合响应面试验确定了超声辅助技

术构建 WPI-LMP BN 的最佳工艺参数（WPI 浓度 2.60%、LMP 浓度 1.20%、超声功率 500 W、超声时间 8 min）。在此条件下所制备的 WPI-LMP BN 包封率为 76.53%，粒径为 318.64 nm，PDI=0.227。扫描电子显微镜显示液滴呈球形且界面致密，傅里叶变换红外光谱证实 WPI 与 LMP 通过氢键及静电作用形成复合界面，可有效抑制丁香酚泄露。稳定性试验结果表明，WPI-LMP BN 在 pH3~10、Na^+≤250 mmol/L 及≤80 ℃ 环境下保持稳定。抗菌实验证实，相较于丁香酚，WPI-LMP BN 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的抑菌能力显著提升（P<0.05）。本研究成功构建了一种稳定、高效的双层纳米乳液递送体系，该体系为食品的天然防腐提供了高效载体。未来工作将集中于两方面：一是通过长期储存实验直接追踪丁香酚的保留率变化，量化其保护效能；二是深入研究不同乳液结构对活性成分控释行为及抗菌动力学的影响。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] VASHISTHA A, SHARMA N, NANAJI Y, et al. Quorum sensing inhibitors as therapeutics: Bacterial biofilm inhibition[J]. Bioorganic Chemistry, 2023, 136: 106551.

[2] ZHANG Yiqin, LU Jingxuan, CUI Kuanbo, et al. The encapsulation strategies of clove essential oil enhance its delivery effect in food preservation applications[J]. Food Chemistry, 2025, 484: 144465.

[3] DEVI K P, SAKTHIVEL R, NISHA S A, et al. Eugenol alters the integrity of cell membrane and acts against the nosocomial pathogen *Proteus mirabilis*[J]. Archives of Pharmacal Research, 2013, 36(3): 282−292.

[4] FIDELIS J, de AGUIAR BERNARDO Y A, ALMEIDA de SOUZA H C, et al. Modulating bacterial virulence: The role of food-plant essential oils in counteracting foodborne pathogen threats-A systematic review[J]. International Journal of Food Microbiology, 2025, 442: 111382.

[5] OVERLY K R. Microwave-assisted isolation of eugenol from cloves[J]. Journal of Chemical Education, 2019, 96(11): 2665−2667.

[6] MARCHESE A, BARBIERI R, COPPO E, et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2017, 43(6): 668−689.

[7] VARGHESE S A, SIENGCHIN S, PARAMESWARANPILLAI J. Essential oils as antimicrobial agents in biopolymer-based food packaging-A comprehensive review[J]. Food Bioscience, 2020, 38: 100785.

[8] de CARVALHO A P A, CONTE-JUNIOR C A. Nanoencapsulation application to prolong postharvest shelf life[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2022, 78: 102825.

[9] ZHANG X H, ISMAIL B B, CHENG H, et al. Emerging chitosan-essential oil films and coatings for food preservation-A review of advances and applications[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 273: 118616.

[10] LI Hongjuan, QIU Xiaobao, REN Chuan, et al. Effect of the whey protein isolate-pectin bilayer emulsion system on the textural properties and oil release characteristics of room-temperature stored processed cheese[J]. LWT, 2024, 203: 116403.

[11] AL-JASSAR S A, MIKAJIRI S, ROOS Y H. Rehydration of whey protein isolate: Effect of temperature, water activity, and storage time[J]. LWT, 2020, 133: 110099.

[12] 李熊志, 胡春, 张海龙, 等. 亚麻籽油多层纳米凝胶乳液的特征、稳定性及消化特性研究[J]. 中国油料作物学报, 2025, 47(6): 1521−1532. [LI Xiongzhi, HU Chun, ZHANG Hailong, et al. Characteristics, stability and digestion traits of multilayer nanogel emulsion of flaxseed oil[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2025, 47(6): 1521−1532.]

[13] KADIYA K, GHOSH S. Pectin degree of esterification influences rheology and digestibility of whey protein isolate-pectin stabilized bilayer oil-in-water nanoemulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 131: 107789.

[14] ARTIGA-ARTIGAS M, de ABREU-MARTINS H H, ZEEB B, et al. Antimicrobial kinetics of nanoemulsions stabilized with protein: Pectin electrostatic complexes[J]. Food and Bioprocess Technology, 2020, 13(11): 1893−1907.

[15] RODRIGUES D C, CUNHA A P, BRITO E S, et al. Mesquite seed gum and palm fruit oil emulsion edible films: Influence of oil content and sonication[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 56: 227−235.

[16] TIAN Ran, FENG Junran, HUANG Guo, et al. Ultrasound driven conformational and physicochemical changes of soy protein hydrolysates[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 68: 105202.

[17] BADJONA A, BRADSHAW R, MILLMAN C, et al. Structural, thermal, and physicochemical properties of ultrasound-assisted extraction of faba bean protein isolate (FPI)[J]. Journal of Food Engineering, 2024, 377: 112082.

[18] WEI Yang, SUN Cuixia, DAI Lei, et al. Novel bilayer emulsions costabilized by zein colloidal particles and propylene glycol alginate. 2. Influence of environmental stresses on stability and rheological properties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(4): 1209−1221.

[19] ZHANG Yue, LIU Yulin, WANG Ruiping, et al. Ultrasonic-assisted preparation of rose oil nanoemulsion: Characterization, anti-*Escherichia coli* activity, and its application in cucumber juice[J]. International Journal of Food Microbiology, 2025, 436: 111191.

[20] MOUSSAOUI F, ALAOUI T. Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2016, 6(1): 32−37.

[21] HUANG Mingyuan, WANG Huhu, XU Xinglian, et al. Effects of nanoemulsion-based edible coatings with composite mixture of rosemary extract and ε-poly-l-lysine on the shelf life of ready-to-eat carbonado chicken[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 102: 105576.

[22] FAN Linlin, SU Wei, ZHANG Xiaoqian, et al. Self-assembly of sophorolipid and eugenol into stable nanoemulsions for synergetic antibacterial properties through alerting membrane integrity [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2024, 234: 113749.

[23] LI Siqi, SUN Jialin, YAN Jun, et al. Development of antibacterial nanoemulsions incorporating thyme oil: Layer-by-layer self-assembly of whey protein isolate and chitosan hydrochloride[J]. Food Chemistry, 2021, 339: 128016.

[24] YIN Zhuofan, YANG Weicong, FANG Jiaqi, et al. Preparation and characterization of an antimicrobial bilayer nanoemulsion encapsulated with eugenol/citral and its application in strawberry

preservation[J]. Food Control, 2024, 156: 110082.
[25] ZHANG Zhenhuan, LIU Yun. Recent progresses of understanding the viscosity of concentrated protein solutions[J]. Current Opinion in Chemical Engineering, 2017, 16: 48−55.
[26] NG S K, NYAM K L, LAI O M, et al. Development of a palm olein oil-in-water (o/w) emulsion stabilized by a whey protein isolate nanofibrils-alginate complex[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 82: 311−317.
[27] PÁEZ-HERNÁNDEZ G, MONDRAGÓN-CORTEZ P, ESPINOSA-ANDREWS H. Developing curcumin nanoemulsions by high-intensity methods: Impact of ultrasonication and microfluidization parameters[J]. LWT, 2019, 111: 291−300.
[28] SABET S, SEAL C K, SWEDLUND P J, et al. Depositing alginate on the surface of bilayer emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 100: 105385.
[29] JARA-QUIJADA E, LAGOS-MUÑOZ V, GUZMÁN-BIZAMA F, et al. Enhancement of polyphenol bio-accessibility from maqui residue through ultrasound-assisted O/W nano-emulsions stabilized with oat protein and sodium alginate[J]. Food Bioscience, 2025, 71: 107239.
[30] SHARMA N, KAUR G, KHATKAR S K. Optimization of emulsification conditions for designing ultrasound assisted curcumin loaded nanoemulsion: Characterization, antioxidant assay and release kinetics[J]. LWT, 2021, 141: 110962.
[31] WANG Danli, WANG Yushi, ZHANG Zhenlei, et al. Degradation, isomerization and stabilization of three dicaffeoylquinic acids under ultrasonic treatment at different pH[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 95: 106401.
[32] SHAO Ying, WU Chunhua, WU Tiantian, et al. Eugenol-chitosan nanoemulsions by ultrasound-mediated emulsification: Formulation, characterization and antimicrobial activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 193: 144−152.
[33] 谭亚欣, 吴松, 杨涵越, 等. 响应面法优化高压微射流制备黑胡椒精油纳米乳液及其成分分析[J]. 食品工业科技, 2025, 46(9): 215−223. [TAN Yaxin, WU Song, YANG Hanyue, et al. Optimization in high-pressure microfluidics preparation of black pepper essential oil nanoemulsion by response surface methodology and its component analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(9): 215−223.]
[34] 许源, 孙玉金, 孙家焕, 等. 纳米乳液的形成机制、制备方法及在食品中应用的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(3): 203−207. [XU Yuan, SUN Yujin, SUN Jiahuan, et al. Research progress on the formation mechanism, preparation method and food application of nanoemulsions[J]. Food Research and Development, 2024, 45(3): 203−207.]
[35] SEPAHVAND S, AMIRI S, RADI M, et al. Effect of thymol and nanostructured lipid carriers (NLCs) incorporated with thymol as antimicrobial agents in sausage[J]. Sustainability, 2022, 14(4): 1973.
[36] MA Xiaobin, YAN Tianyi, MIAO Song, et al. *In vitro* digestion and storage stability of *β*-carotene-loaded nanoemulsion stabilized by soy protein isolate (SPI)-*Citrus* pectin (CP) complex/conjugate prepared with ultrasound[J]. Foods, 2022, 11(16): 2410.
[37] WANG Liping, ZHAN Jinling, MA Rongrong, et al. Preparation of starch-based nanoemulsion for sustained release and enhanced bioaccessibility of quercetin[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2023, 665: 131218.
[38] de SOUZA E J D, KRINGEL D H, YURGEL V C, et al. Starch-octenyl succinic anhydride nanoemulsions with clove and white thyme essential oils: *In vitro* antifungal activity and application on orange (*Citrus sinensis* cv. Salustiana) preservation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2025, 428: 110994.
[39] HUANG Kai, LIU Runan, ZHANG Ying, et al. Characteristics of two cedarwood essential oil emulsions and their antioxidant and antibacterial activities[J]. Food Chemistry, 2021, 346: 128970.
[40] SINGH I R, PULIKKAL A K. Preparation, stability and biological activity of essential oil-based nano emulsions: A comprehensive review[J]. OpenNano, 2022, 8: 100066.
[41] GNANASAMBANDAM R, PROCTOR A. Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy[J]. Food Chemistry, 2000, 68(3): 327−332.
[42] GU Xiaolian, LI Wanbing, JIANG Xiaoyu, et al. Pectin-coated whey protein isolate/zein self-aggregated nanoparticles as curcumin delivery vehicles: Effects of heating, pH, and adding sequence[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 258: 128892.
[43] PAOLONI L, PATTI A, MANGANO F. The hydrogen bond with carbonyl groups: Theoretical study of the correlation between the X-H stretching frequency shift and the C=O group proper[J]. Journal of Molecular Structure, 1975, 27(1): 123−137.
[44] TOKLE T, MCCLEMENTS D J. Physicochemical properties of lactoferrin stabilized oil-in-water emulsions: Effects of pH, salt and heating[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 976−982.
[45] LEE S J, CHOI S J, LI Y, et al. Protein-stabilized nanoemulsions and emulsions: Comparison of physicochemical stability, lipid oxidation, and lipase digestibility[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(1): 415−427.
[46] TEO A, GOH K K T, WEN J Y, et al. Physicochemical properties of whey protein, lactoferrin and Tween 20 stabilised nanoemulsions: Effect of temperature, pH and salt[J]. Food Chemistry, 2016, 197: 297−306.
[47] SLIWINSKI E L, ROUBOS P J, ZOET F D, et al. Effects of heat on physicochemical properties of whey protein-stabilised emulsions[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003, 31(1−4): 231−242.
[48] ABBAS S, HAYAT K, KARANGWA E, et al. An overview of ultrasound-assisted food-grade nanoemulsions[J]. Food Engineering Reviews, 2013, 5(3): 139−157.
[49] ESPINOSA-SANDOVAL L, OCHOA-MARTÍNEZ C, AYALA-APONTE A, et al. Polysaccharide-based multilayer nanoemulsions loaded with oregano oil: Production, characterization, and *in vitro* digestion assessment[J]. Nanomaterials, 2021, 11(4): 878.
[50] HUANG Yaocheng, LIN Jiawei, TANG Xiangyi, et al. Grape seed proanthocyanidin-loaded gel-like W/O/W emulsion stabilized by genipin-crosslinked alkaline soluble polysaccharides-whey protein isolate conjugates: Fabrication, stability, and *in vitro* digestion [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 186: 759−769.
[51] WANG Danli, BAO Anxiu, YUAN Yawen, et al. Whey protein isolate-stabilized *Gardenia* fruit oil nanoemulsions: Ultrasonic preparation, characterization and applications in nutraceuticals delivery[J]. Industrial Crops and Products, 2024, 212: 118345.
[52] GENTILE L. Protein-polysaccharide interactions and aggregates in food formulations[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2020, 48: 18−27.