

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



ĐẶNG VĂN PHÚ

**NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO VÀ KHẢO SÁT HIỆU QUẢ PHÒNG
TRỪ NẤM *Colletotrichum truncatum* GÂY BỆNH THÁN THU
TRÊN CÂY ĐẬU NÀNH (*Glycine max*) CỦA PHỨC
OLIGOCHITOSAN-Zn²⁺**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA SINH HỌC

TP. HỒ CHÍ MINH – 2024

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

ĐẶNG VĂN PHÚ

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO VÀ KHẢO SÁT HIỆU QUẢ PHÒNG
TRỪ NẤM *Colletotrichum truncatum* GÂY BỆNH THÁN THU
TRÊN CÂY ĐẬU NÀNH (*Glycine max*) CỦA PHỨC
OLIGOCHITOSAN-Zn²⁺

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA SINH HỌC

Mã số: 9 42 01 16

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1

Người hướng dẫn 2

TS. Bùi Duy Du

GS.TS. Nguyễn Quốc Hiến

TP. HỒ CHÍ MINH – 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: “Nghiên cứu chế tạo và khảo sát hiệu quả phòng trừ nấm *Colletotrichum truncatum* gây bệnh thán thư trên cây đậu nành (*glycine max*) của phức oligochitosan-Zn²⁺” là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của TS. Bùi Duy Du và GS.TS. Nguyễn Quốc Hiến. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày tháng 3 năm 2024

Tác giả luận án



NCS. Đặng Văn Phú

LỜI CẢM ƠN

L luận án này được hoàn thành tại Viện Sinh học Nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trong hành trình nghiên cứu và hoàn thành luận án, tác giả đã nhận được nhiều sự giúp đỡ quý báu từ các thầy cô, các nhà khoa học, các đồng nghiệp, bạn bè và gia đình.

Tôi muốn biểu đạt lòng biết ơn sâu sắc đến TS. Bùi Duy Du và GS.TS. Nguyễn Quốc Hiến đã tận tình hướng dẫn. Những kiến thức sâu rộng và sự chỉ dẫn tận tâm của các thầy đã thúc đẩy sự phát triển của em trong lĩnh vực nghiên cứu này. Em đã học được rất nhiều từ các thầy và luôn trân trọng những giá trị ấy.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến các thầy cô, các đồng nghiệp và tập thể Viện Sinh học Nhiệt đới đã truyền thụ kiến thức và tạo mọi điều kiện tốt nhất cho tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện đề tài luận án; cảm ơn Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao đã tạo điều kiện cho tôi tổng hợp vật liệu và thử hoạt tính của chế phẩm; xin cảm ơn Trung tâm Khảo nghiệm Cây trồng, Hưng Lộc, Đồng Nai đã tư vấn và thực hiện khảo nghiệm chế phẩm; biết ơn những người đã cùng tham gia nghiên cứu, các đóng góp đó làm cho nghiên cứu này trở nên có giá trị và ý nghĩa.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn đến Ban Lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ và Viện Sinh học Nhiệt đới đã giúp đỡ, hỗ trợ mọi mặt tận tình và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi để hoàn thành luận án.

Tôi chân thành cảm ơn gia đình, bạn bè và những người thân đã luôn quan tâm, khích lệ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu. Trân trọng cảm ơn tất cả mọi người./.

Hà Nội, ngày tháng 3 năm 2024

Tác giả luận án



NCS. Đặng Văn Phú

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH	ix
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề	1
2. Nội dung chính của luận án	2
3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn	2
4. Những đóng góp mới của luận án	3
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	4
1.1. Nguồn gốc, đặc trưng cấu trúc của chitosan và oligochitosan	4
1.1.1. Chitosan	4
1.1.2. Oligochitosan và các phương pháp chế tạo	8
1.2. Chế tạo phức oligochitosan-Zn ²⁺	14
1.3. Hiệu ứng phòng trừ bệnh thực vật của oligochitosan, Zn ²⁺ và phức oligochitosan-Zn ²⁺	16
1.3.1. Hiệu ứng phòng trừ bệnh của oligochitosan	16
1.3.2. Hiệu ứng phòng trừ bệnh của Zn ²⁺	21
1.3.3. Hiệu ứng phòng trừ bệnh của phức oligochitosan-M ²⁺	22
1.4. Chitinase trong hệ thống phòng bệnh cây trồng	23
1.5. Đậu nành và bệnh thán thư do nấm <i>Colletotrichum truncatum</i>	24
1.5.1. Cây đậu nành	24
1.5.2. Nấm <i>Colletotrichum truncatum</i> gây bệnh thán thư trên đậu nành	26
1.6. Tình hình nghiên cứu ngoài nước	28
1.7. Tình hình nghiên cứu trong nước	31

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	33
2.1. Nguyên vật liệu và thiết bị	33
2.1.1. Nguyên vật liệu và hóa chất	33
2.1.2. Thiết bị và dụng cụ	34
2.2. Phương pháp nghiên cứu	35
2.2.1. Chế tạo oligochitosan, phức oligochitosan-Zn ²⁺	35
và xác định các đặc trưng	
2.2.2. Xác định hiệu lực ức chế nấm <i>Colletotrichum truncatum</i>	40
trong điều kiện phòng thí nghiệm (<i>in vitro</i>)	
2.2.3. Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh thán thư và các chỉ tiêu	41
sinh trưởng của phức oligochitosan-Zn ²⁺ trên cây đậu nành	
trong điều kiện nhà kính	
2.2.4. Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh và hiệu lực nông học	46
của phức oligochitosan-Zn ²⁺ đối với cây đậu nành	
trên ruộng thí nghiệm	
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	50
3.1. Chế tạo oligochitosan khối lượng phân tử 2 – 8 kDa	50
3.1.1. Oxi hóa cắt mạch dị thể giảm khối lượng phân tử chitosan	50
3.1.2. Cắt mạch đồng thể bằng bức xạ gamma Co ⁶⁰ kết hợp H ₂ O ₂	54
chế tạo oligochitosan	
3.2. Chế tạo phức oligochitosan-Zn ²⁺ và xác định đặc trưng tính chất	67
3.3. Hiệu lực kháng nấm <i>Colletotrichum truncatum</i>	78
trong điều kiện phòng thí nghiệm (<i>in vitro</i>)	
3.4. Hiệu ứng sinh học của phức oligochitosan-Zn ²⁺ trên cây đậu nành	82
trồng trong nhà kính	
3.4.1. Hiệu quả kích tạo chitinase, kích thích sinh trưởng	82
và kiểm soát bệnh trên cây đậu nành của phức oligochitosan-Zn ²⁺	
với oligochitosan KLPT khác nhau	
3.4.2. Hiệu quả kích tạo chitinase, kích thích sinh trưởng và kiểm soát	88
bệnh trên cây đậu nành của phức oligochitosan-Zn ²⁺ theo nồng độ	
3.4.3. Hiệu quả tác động đồng vận kích tạo chitinase, kích thích sinh trưởng	93
và kiểm soát bệnh trên cây đậu nành của phức oligochitosan-Zn ²⁺	

3.5. Hiệu ứng phòng trừ bệnh và hiệu lực nông học của oligochitosan	100
và phức oligochitosan-Zn ²⁺ đối với đậu nành trên ruộng khảo nghiệm	
3.5.1. Ảnh hưởng của oligochitosan và oligochitosan-Zn ²⁺ đến hiệu quả	101
<i>phòng trừ bệnh hại trên cây đậu nành thời điểm ra hoa</i>	
3.5.2. Ảnh hưởng của oligochitosan và oligochitosan-Zn ²⁺ đến các	102
<i>chỉ tiêu sinh trưởng và các yếu tố cấu thành năng suất của đậu nành</i>	
3.5.3. Ảnh hưởng của oligochitosan và oligochitosan-Zn ²⁺ đến yếu tố	103
<i>cấu thành năng suất và năng suất của đậu nành</i>	
3.5.4. Ảnh hưởng của phun oligochitosan và phức oligochitosan-Zn ²⁺	105
<i>đến năng suất đậu nành và hiệu quả kinh tế</i>	
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	107
KẾT LUẬN	107
KIẾN NGHỊ	107
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ	108
TÀI LIỆU THAM KHẢO	109
PHỤ LỤC	125

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

OC	Oligochitosan
GluN	Đường D-glucosamine
GluNAc	Đường N-acetyl-D-glucosamine
CTS	Chitosan
KLPT	Khối lượng phân tử
ĐĐA	Độ deacetyl
PI	Chỉ số đa phân tán KLPT của polymer
Gs	Hiệu suất cắt mạch bức xạ
Zn ²⁺	Kẽm ion
OC2,5	Oligochitosan có KLPT 2,5 kDa
OC5,1	Oligochitosan có KLPT 5,1 kDa
OC7,8	Oligochitosan có KLPT 7,8 kDa
OC-Zn ²⁺	Phức oligochitosan với Zn ²⁺
-NH ₂ /Zn ²⁺	Tỷ lệ phần mol của -NH ₂ (OC) đối với Zn ²⁺
CA	Hoạt tính enzyme chitinase
AE	Hiệu lực ức chế nấm
DI	Tỷ lệ bệnh
DS	Chỉ số bệnh
UV-Vis	Quang phổ ánh sáng tử ngoại – khả kiến
GPC	Sắc ký gel thẩm qua
FTIR	Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier
¹ H-NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
XRD	Phổ nhiễu xạ tia X
EDX	Phổ tán sắc năng lượng tia X
ICP-AES	Phổ phát xạ nguyên tử cảm ứng plasma.

DANH MỤC CÁC BẢNG

<i>Bảng 1.1:</i> Một số thông số đặc trưng của chitin và chitosan	6
<i>Bảng 2.1:</i> Số lượng muối kẽm $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (g) cần thiết bổ sung vào 100 ml dung dịch oligochitosan để tạo phức đạt tỷ lệ phần mol ($-NH_2/Zn^{2+}$) theo yêu cầu	36
<i>Bảng 2.2:</i> Thành phần tác nhân tạo phản ứng đường khử theo nồng độ chất chuẩn GluNAc ($\mu\text{mol/ml}$)	44
<i>Bảng 3.1:</i> KLPT (Mw), thời gian lưu (t_r) và chỉ số phân tán KLPT (PI) của các chất chuẩn pullulan	51
<i>Bảng 3.2:</i> Diện tích tích phân cường độ (I) của các proton và kết quả độ deacetyl (ĐĐA) của các oligochitosan có KLPT khác nhau	62
<i>Bảng 3.3:</i> KLPT (Mw, Mn) và chỉ số phân tán KLPT (PI) của các mẫu oligochitosan cắt mạch bức xạ với liều xạ 21 kGy	64
<i>Bảng 3.4:</i> Kết quả phân tích hàm lượng kẽm trong các phức OC- Zn^{2+} có hợp phần khác nhau.	76
<i>Bảng 3.5:</i> Hoạt lực kháng nấm <i>C. truncatum</i> (AE%) theo nồng độ của oligochitosan 5,1 kDa; Zn^{2+} ; và phức OC5,1- Zn^{2+} với tỷ lệ phần mol khác nhau	79
<i>Bảng 3.6:</i> Tổng hàm lượng chlorophyll, chiều cao cây và hàm lượng tích lũy chất khô của cây đậu nành được xử lý phun các dung dịch phức oligochitosan- Zn^{2+} với OC KLPT khác nhau, cùng tỷ lệ phần mol 1/0,5	84
<i>Bảng 3.7:</i> Tổng hàm lượng chlorophyll, chiều cao cây và hàm lượng tích lũy chất khô của cây đậu nành được xử lý phun các dung dịch phức oligochitosan- Zn^{2+} tỷ lệ phần mol 1/0,5 theo nồng độ khác nhau	89
<i>Bảng 3.8:</i> Hoạt tính chitinase (mU/g lá tươi) tại các thời điểm (ngày) sau chủng bệnh trên cây đậu nành đã được xử lý phun các dung dịch phức oligochitosan- Zn^{2+} với OC 5,1 kDa, tỷ lệ phần mol 1/0,5 theo nồng độ khác nhau	91
<i>Bảng 3.9:</i> Tổng hàm lượng chlorophyll, chiều cao cây và hàm lượng tích lũy chất khô của cây đậu nành được xử lý phun các dung dịch OC 5,1 kDa; phức oligochitosan- Zn^{2+} tỷ lệ phần mol 1/0,5; và Zn^{2+}	93

<i>Bảng 3.10:</i> Hoạt tính chitinase (mU/g lá tươi) tại các thời điểm (ngày) sau95 chúng bệnh trên các cây đậu nành đã được xử phun các dung dịch OC 5,1 kDa; phức oligochitosan-Zn ²⁺ với tỷ lệ phần mol 1/0,5; và Zn ²⁺	
<i>Bảng 3.11:</i> Tỷ lệ bệnh (DI%) và chỉ số bệnh (DS%) thán thư tại thời điểm99 21 ngày sau chúng bệnh trên các cây đậu nành đã được xử phun các dung dịch OC 5,1 kDa; phức oligochitosan-Zn ²⁺ tỷ lệ phần mol 1/0,5; và Zn ²⁺	
<i>Bảng 3.12:</i> Hoạt tính chitinase, chỉ số sâu cuốn lá và bệnh hại trên cây101 đậu nành được xử lý phun OC 5,1 kDa và phức OC5,1-Zn ²⁺	
<i>Bảng 3.13:</i> Các chỉ tiêu sinh trưởng và các yếu tố cấu thành năng suất của102 đậu nành được xử lý phun OC 5,1 kDa và phức OC5,1-Zn ²⁺	
<i>Bảng 3.14:</i> Các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất của cây đậu nành104 được xử lý phun OC 5,1 kDa và phức OC5,1-Zn ²⁺	
<i>Bảng 3.15:</i> Năng suất đậu nành và hiệu quả kinh tế105	

DANH MỤC CÁC HÌNH

<i>Hình 1.1:</i> Nguồn nguyên liệu chế tạo chitin và chitosan	4
<i>Hình 1.2:</i> Công thức cấu tạo của chitosan	5
<i>Hình 1.3:</i> Các phương pháp chế tạo oligochitosan phổ biến	8
<i>Hình 1.4:</i> Sơ đồ phản ứng tách hydro trên phân tử chitosan bởi gốc tự do $\cdot\text{OH}$	12
<i>Hình 1.5:</i> Kiểu cấu trúc phức chitosan- Zn^{2+} hay oligochitosan- Zn^{2+}	15
<i>Hình 1.6:</i> Các liên kết phối trí giữa ion kim loại với các đơn vị cấu trúc chitosan .	16
<i>Hình 1.7:</i> Hoạt động kiểm soát và kích kháng bệnh thực vật	20
của chitosan/oligochitosan	
<i>Hình 1.8:</i> Cơ chế kềm kích thích phản vệ ở cây trồng	21
<i>Hình 1.9:</i> Tỷ lệ bệnh đốm trắng trên lá cây nho xử lý OC, Cu^{2+} ,	22
và phức OC- Cu^{2+}	
<i>Hình 2.1:</i> Sơ đồ mô tả tóm tắt phương pháp chế tạo và đánh giá các đặc trưng	40
tính chất của oilgochitosan và phức oligochitosan- Zn^{2+}	
<i>Hình 2.2:</i> Cây đậu nành thí nghiệm trong nhà kính	41
<i>Hình 2.3:</i> Cây đậu nành trồng trên ruộng thí nghiệm	47
<i>Hình 2.4:</i> Sơ đồ tóm tắt thực nghiệm đánh giá hiệu ứng sinh học	49
của phức oligochitosan- Zn^{2+}	
<i>Hình 3.1:</i> Hình dạng vảy chitosan ban đầu và chitosan oxi hóa	50
<i>Hình 3.2:</i> Đường chuẩn tương quan giữa $\log(\text{Mw})$ với t_r của pullulan	51
<i>Hình 3.3:</i> Phổ GPC của chitosan ban đầu và chitosan oxi hóa	51
<i>Hình 3.4:</i> Phổ FTIR của chitosan ban đầu ~171 kDa	53
và chitosan oxi hóa ~45 kDa	
<i>Hình 3.5:</i> KLPT của chitosan theo liều xạ; và mối liên hệ giữa	55
$(1/\text{Mw} - 1/\text{Mw}_0)$ theo liều xạ của các mẫu chitosan cắt mạch	
trong điều kiện khác nhau	
<i>Hình 3.6:</i> Màu sắc của các dung dịch chitosan cắt mạch có KLPT khác nhau	58
<i>Hình 3.7:</i> Màu sắc bột sau tủa – làm khô của chitosan 45 kDa	58
và oligochitosan có KLPT khác nhau	

<i>Hình 3.8:</i> Phổ UV-Vis của chitosan 45 kDa và oligochitosan có KLPT khác nhau	59
<i>Hình 3.9:</i> Phổ FTIR của oligochitosan có KLPT khác nhau	60
<i>Hình 3.10:</i> Phổ ^1H NMR của oligochitosan có KLPT khác nhau	61
<i>Hình 3.11:</i> Phổ GPC của oligochitosan có KLPT khác nhau	64
<i>Hình 3.12:</i> Giản đồ XRD của chitosan 45 kDa và oligochitosan có KLPT khác nhau	65
<i>Hình 3.13:</i> Hình ảnh dung dịch và bột của phức oligochitosan- Zn^{2+} theo KLPT oligochitosan khác nhau, tại cùng tỷ lệ phần mol 1/0,5	68
<i>Hình 3.14:</i> Phổ UV-Vis của phức oligochitosan- Zn^{2+} với OC KLPT khác nhau, cùng tỷ lệ phần mol 1/0,5	69
<i>Hình 3.15:</i> Hình ảnh dung dịch và bột của phức oligochitosan- Zn^{2+} theo tỷ lệ phần mol khác nhau, tại cùng KLPT OC 5,1 kDa	70
<i>Hình 3.16:</i> Phổ UV-Vis của phức oligochitosan 5,1 kDa với Zn^{2+} có tỷ lệ phần mol khác nhau	71
<i>Hình 3.17:</i> Phổ FTIR của phức oligochitosan- Zn^{2+} với OC KLPT khác nhau, cùng tỷ lệ phần mol 1/0,5	72
<i>Hình 3.18:</i> Mô hình kiểu cấu trúc liên kết phối trí của phức oligochitosan- Zn^{2+} ...	74
<i>Hình 3.19:</i> Phổ EDX của oligochitosan 5,1 kDa và của phức oligochitosan- Zn^{2+} với OC KLPT khác nhau, tại cùng tỷ lệ phần mol 1/0,5	75
<i>Hình 3.20:</i> Phổ XRD của muối kẽm và của phức oligochitosan- Zn^{2+} với OC KLPT khác nhau, tại cùng tỷ lệ phần mol 1/0,5	77
<i>Hình 3.21:</i> Sự phát triển của sợi nấm <i>C. truncatum</i> trên các đĩa thạch PDA có bổ sung các chất thử nghiệm OC 5,1 kDa; Zn^{2+} ; và phức OC5,1- Zn^{2+} với tỷ lệ phần mol khác nhau	80
<i>Hình 3.22:</i> Đường chuẩn N-acetyl-D-glucosamine (GluNAc) theo mối tương quan nồng độ ($\mu\text{mol/ml}$) với mật độ quang (ΔOD_{540})	83
<i>Hình 3.23:</i> Hoạt tính chitinase tại các thời điểm (ngày) sau chủng bệnh trên cây đậu nành đã được xử lý phun các dung dịch phức oligochitosan- Zn^{2+} với OC có KLPT khác nhau, cùng tỷ lệ phần mol 1/0,5	85

<i>Hình 3.24:</i> Tỷ lệ bệnh (DI%) và chỉ số bệnh (DS%) thán thư tại thời điểm 87 21 ngày sau chủng bệnh trên các cây đậu nành đã được xử phun các dung dịch phức oligochitosan-Zn ²⁺ với OC KLPT khác nhau, cùng tỷ lệ phân mol 1/0,5	
<i>Hình 3.25:</i> Tỷ lệ bệnh (DI%) và chỉ số bệnh (DS%) thán thư tại thời điểm 92 21 ngày sau chủng bệnh trên các cây đậu nành đã được xử phun các dung dịch phức oligochitosan-Zn ²⁺ với nồng độ khác nhau	
<i>Hình 3.26:</i> Cây đậu nành tại thời điểm ngày thứ 36 sau gieo được phun 94 các dung dịch OC 5,1 kDa; phức oligochitosan-Zn ²⁺ ; và Zn ²⁺	
<i>Hình 3.27:</i> Biểu hiện bệnh thán thư trên cây đậu nành sau 07 ngày chủng 98 nấm <i>C. truncatum</i>	
<i>Hình 3.28:</i> Cây đậu nành giai đoạn quả chắc xanh 103	
<i>Hình 3.29:</i> Đậu nành giai đoạn quả chín trước khi thu hoạch 105	

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Oligochitosan (OC) là loại polysaccharide tự nhiên có khối lượng phân tử (KLPT) thấp được chế tạo bằng phương pháp cắt mạch chitosan bởi các tác nhân như enzyme, hóa học và bức xạ. OC đã được nghiên cứu và minh chứng là không độc, có khả năng ức chế vi sinh vật gây bệnh, có hiệu ứng kích kháng và phòng trừ đối với nhiều loại bệnh gây hại trên thực vật. OC có KLPT < 10 kDa thể hiện hiệu ứng kích kháng bệnh hiệu quả.

Cũng như chitosan, OC có khả năng tạo phức với nhiều ion kim loại như Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} ,... thông qua liên kết phối trí với nhóm amin ($-\text{NH}_2$) và nhóm hydroxyl ($-\text{OH}$) trong phân tử OC, làm tăng cường khả năng kháng khuẩn, kháng nấm. Trong đó, phức OC- Zn^{2+} được quan tâm nghiên cứu và sử dụng phòng trừ bệnh cho cây trồng. Kẽm là nguyên tố vi lượng thiết yếu cho sự sinh trưởng, phát triển và có vai trò trong việc tăng cường các phản ứng phòng vệ của cây trồng. Một số nghiên cứu đã minh chứng phức OC- Zn^{2+} có khả năng kháng vi khuẩn, nấm bệnh cao hơn từ 2 – 8 lần so với OC và 4 – 16 lần so với Zn^{2+} . Ngoài ra, việc sử dụng kẽm trên thực vật còn làm tăng tích lũy vi chất dinh dưỡng thiết yếu trong nông sản mà thường thiếu hụt trong chế độ ăn uống của con người. Vì vậy, phức OC- Zn^{2+} là loại vật liệu tiềm năng có thể ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp an toàn.

Trong sản xuất nông nghiệp tại Việt Nam, đậu nành (*Glycine max*) là cây trồng quan trọng vì là cây thực phẩm lâu đời, là nguồn cung cấp protein cho người và vật nuôi. Diện tích trồng đậu nành tại Việt Nam theo thống kê đến năm 2020 là 166.000 ha với sản lượng đạt 265.000 tấn nhưng chỉ đủ cung cấp 8 – 10% cho nhu cầu sử dụng trong nước. Vì vậy, phát triển sản xuất đậu nành để đáp ứng nhu cầu là hướng đi đúng đắn. Xu hướng toàn cầu trong sản xuất nông nghiệp an toàn nói chung và đậu nành nói riêng, việc kiểm soát các loại bệnh hại thường xuyên do nấm *Colletotrichum truncatum*, *Fusarium solani*,... bằng chế phẩm như phức OC- Zn^{2+} là cần thiết. Tuy nhiên, tác động của phức OC- Zn^{2+} đối với mỗi loại cây trồng và mỗi loại vi sinh vật gây bệnh là khác nhau, trong đó khả năng phòng trừ bệnh thán thư của phức trên cây đậu nành do nấm *C. truncatum* chưa được nghiên cứu.

Vì các lý do trên, chúng tôi chọn và thực hiện đề tài “**Nghiên cứu chế tạo và khảo sát hiệu quả phòng trừ nấm *Colletotrichum truncatum* gây bệnh thán thư trên cây đậu nành (*Glycine max*) của phức oligochitosan- Zn^{2+} ”**

Với mục tiêu: Nghiên cứu chế tạo sản phẩm phức oligochitosan- Zn^{2+} có hiệu

lực phòng trừ bệnh thán thư hiệu quả trên cây đậu nành để ứng dụng làm chất bảo vệ cây trồng nguồn gốc sinh học, phục vụ phát triển nông nghiệp an toàn, bền vững.

2. Nội dung chính của luận án

Nghiên cứu chế tạo oligochitosan (OC) có khối lượng phân tử (KLPT) từ 2 – 8 kDa bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co^{60} kết hợp với sử dụng tác nhân oxy hóa H_2O_2 nồng độ thấp và xác định các đặc trưng tính chất của OC.

Nghiên cứu chế tạo phức OC- Zn^{2+} và xác định đặc trưng tính chất của phức.

Nghiên cứu hiệu lực kháng nấm *Colletotrichum truncatum* của phức OC- Zn^{2+} trong điều kiện phòng thí nghiệm (*in vitro*).

Nghiên cứu hiệu ứng kích tạo enzyme chitinase và các chỉ tiêu tăng trưởng của cây đậu nành được xử lý với phức OC- Zn^{2+} và gây nhiễm nấm *C. truncatum* gây bệnh thán thư trong thí nghiệm nhà kính.

Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh và hiệu lực nông học của phức OC- Zn^{2+} đối với cây đậu nành trên thí nghiệm đồng ruộng.

3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

3.1. Ý nghĩa khoa học

Luận án đóng góp dữ liệu khoa học đối với phương pháp điều chỉnh giảm KLPT chitosan bằng chiếu xạ gamma Co^{60} kết hợp với H_2O_2 . Sự kết hợp giữa hai tác nhân đã làm giảm liều xạ, tạo ra OC có KLPT thấp nhưng không làm thay đổi đáng kể cấu trúc hóa học so với chitosan ban đầu. Đã xác định được hiệu suất cắt mạch (Gs) đối với các dung dịch: chitosan 4%, chitosan 4% + 0,5% H_2O_2 , và chitosan 2% + 0,5% H_2O_2 tương ứng là 0,40; 0,67; và 0,74 $\mu\text{mol}/\text{J}$.

Đã chế tạo thành công dung dịch phức OC- Zn^{2+} với tỷ lệ mol $-\text{NH}_2/\text{Zn}^{2+}$ là 1/0,25; 1/0,5; 1/1 và khảo sát các tính chất đặc trưng của phức. Đã thiết lập mô hình cấu trúc liên kết phối trí giữa OC với Zn^{2+} chủ yếu theo dạng cầu nối, dạng phức có độ ổn định tốt hơn so với cấu trúc dạng treo.

Kết quả nghiên cứu hiệu lực sinh học của phức OC- Zn^{2+} cho thấy phức thể hiện lực kháng nấm *C. truncatum* và hiệu ứng kích tạo enzyme chitinase trên cây đậu nành theo kiểu tác động đồng vận giữa OC và Zn^{2+} .

Phức OC- Zn^{2+} làm giảm tỷ lệ và chỉ số bệnh thán thư trên đậu nành, và tăng năng suất đậu nành đạt 19,2% so với đối chứng và cao hơn so với OC (11,9%).

3.2. Ý nghĩa thực tiễn

Kết quả của luận án là cơ sở để xây dựng quy trình sản xuất OC và phức OC-Zn²⁺ với OC có KLPT và tỷ lệ mol -NH₂/Zn²⁺ khác nhau bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co⁶⁰ kết hợp H₂O₂ nồng độ thấp nhằm giảm liều xạ và giảm giá thành sản phẩm, đồng thời có thể triển khai sản xuất quy mô lớn trên máy chiếu xạ công nghiệp.

Sản phẩm OC và phức OC-Zn²⁺ tạo ra từ kết quả của luận án ngoài mục đích ứng dụng kiểm soát bệnh hại thực vật để thay thế thuốc bảo vệ thực vật độc hại, mà còn có tiềm năng ứng dụng trong thức ăn chăn nuôi, thực phẩm và dược phẩm,.. .

4. Những đóng góp mới của luận án

1. Đã chế tạo thành công phức OC-Zn²⁺ với tỷ lệ phần mol (-NH₂/Zn²⁺) và OC KLPT khác nhau và đã xác định một số đặc trưng tính chất của phức OC-Zn²⁺. Phức OC-Zn²⁺ từ OC 5,1 kDa, tỷ lệ phần mol 1/0,5 có cấu trúc phức chủ yếu là dạng cầu nối ổn định đạt hơn 92% lượng Zn²⁺ liên kết phối trí với OC.
2. Đã đánh giá phức OC-Zn²⁺ có hiệu quả phòng trừ nấm *Colletotrichum truncatum* gây bệnh thán thư, cải thiện chỉ tiêu sinh trưởng và gia tăng năng suất đối với cây đậu nành. Đã chứng minh được hiệu quả phòng trừ nấm bệnh của phức phụ thuộc vào KLPT OC và nồng độ OC-Zn²⁺ sử dụng.

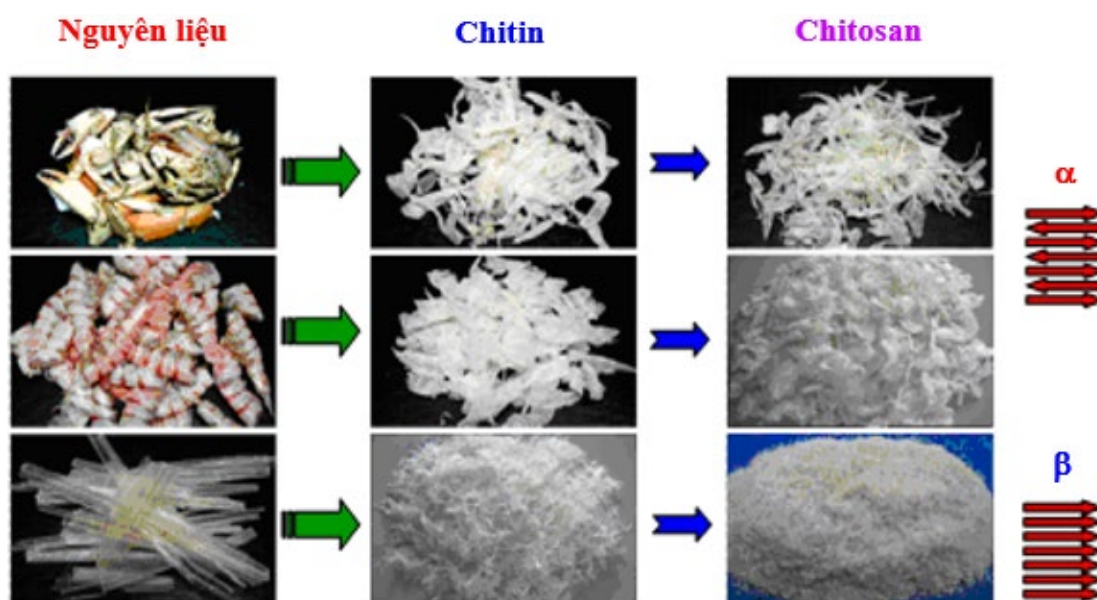
Kết quả đạt được trong nội dung luận án góp phần làm cơ sở khoa học và ý nghĩa thực tiễn để nghiên cứu ứng dụng chế phẩm nông dược an toàn phục vụ phát triển nông nghiệp bền vững, nâng giá trị nông phẩm, và gia tăng hiệu quả kinh tế.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Nguồn gốc, đặc trưng cấu trúc của chitosan và oligochitosan

1.1.1. Chitosan

Trong thực tiễn, chitosan thường được tách chiết ở quy mô lớn từ nguồn chitin vỏ tôm, cua, mai mực, đây là những nguồn phế phụ phẩm từ các nhà máy chế biến thủy hải sản (Hình 1.1). Trong tự nhiên, chitin tồn tại ở cả thực vật và động vật, là một polysaccharide có trữ lượng lớn, xếp thứ 2 sau cellulose [1].

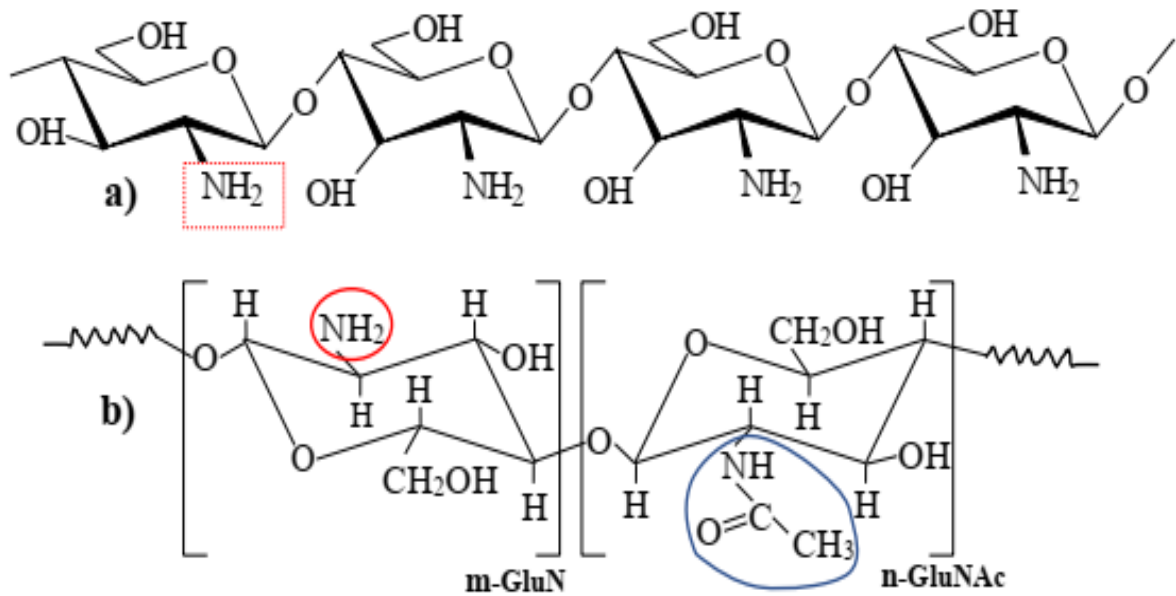


Hình 1.1: Nguồn nguyên liệu chế tạo chitin và chitosan [2]

Chitin không tan trong nước, axit loãng, kiềm loãng và đặc, ancol, và hầu hết các dung môi hữu cơ. Chitin tan trong axit vô cơ đặc như HCl, H₂SO₄, H₃PO₄ và thường kèm theo sự giảm khối lượng phân tử. Chitin tan trong một số dung môi hữu cơ có chứa clorua liti như: N,N-dimetylacetamid - 5% LiCl và N-etyl pyrrolydon - LiCl [3, 4]. Tuy nhiên, với đặc thù cấu trúc và dung môi hòa tan chitin làm hạn chế khả năng ứng dụng, do vậy nhiều nghiên cứu biến tính chitin đã được thực hiện. Chuyển hóa chitin thành chitosan là một trong những sản phẩm biến tính phổ biến.

Chitosan là một trong những polysaccharide tự nhiên có phạm vi ứng dụng rộng rãi do có những đặc tính như không độc, có khả năng phân hủy sinh học, kháng khuẩn, kháng nấm và có tính tương hợp sinh học [3].

Chitosan là một copolymer phân hủy sinh học bao gồm các đơn vị D-glucosamine (GluN) và N-acetyl-D-glucosamine (GluNAc), là sản phẩm thu được từ quá trình deacetyl hóa tách nhóm acetyl khỏi nhóm amino ở vị trí C₂ (Hình 1.2).



Hình 1.2: Công thức cấu tạo của chitosan [2, 3]

Chitosan là chỉ những sản phẩm deacetyl của chitin đạt hơn 50% [5]. Đơn vị cấu tạo trong phân tử chitosan là D-glucosamine (Hình 1.2a), nhưng trên thực tế mạch phân tử chitosan vẫn tồn tại nhóm acetyl, đan xen do sự deacetyl hóa chưa hoàn toàn (Hình 1.2b). Trong phân tử chitosan, các mắt xích được liên kết với nhau như sau [4]:

- Liên kết β-glycoside mỗi mắt xích lệch nhau một góc 180° tạo nên mạch xoắn
- Tương tác Vander Waals ($d = 0,3 - 0,6 \mu\text{m}$)
- Khi khoảng cách giữa các mắt xích quá nhỏ ($0,3 \mu\text{m}$), giữa chúng xuất hiện liên kết hydro, do tương tác giữa nhóm -OH và -NH₂ trong phân tử.

Chitosan có cấu trúc tinh thể về thực chất không đối so với cấu trúc của chitin.

Ở trạng thái tự nhiên, chitosan là chất rắn, xốp nhẹ, hình vảy có thể xay nhỏ với kích thước khác nhau. Chitosan có màu trắng hoặc vàng nhạt, không mùi, không vị và có một số đặc trưng như liệt kê trên Bảng 1.1 [6].

Trong chitin có nhiều liên kết hydro nên chúng dễ bị phân chia nhỏ ở nhiệt độ cao. Đặc tính hóa học này làm cho chitin khó hòa tan trong nước, axit loãng, ancol, hoặc trong những dung môi hữu cơ dưới điều kiện bình thường. Trái lại, chitosan do có nhóm -NH₂ tự do, không tan trong nước nhưng tan tốt trong các dung môi hữu cơ như axit formic, axit adipic, axit acetic, axit lactic,.. trong trường hợp này nhóm amin tự do bắt đầu hình thành nhóm -NH₃⁺ [6]. Nhờ đặc tính này mà chitosan có giá trị hơn chitin cho những ứng dụng trong công nghiệp, có giá trị thương mại cao và có thể chế tạo thành nhiều dạng khác nhau như màng mỏng, sợi, bột,...

Bảng 1.1: Một số thông số đặc trưng của chitin và chitosan [4, 6]

Thông số	Chitin	Chitosan
Tên hóa học	Polyacetylaminglucoza	Polyaminoglucoza
Công thức phân tử	$(C_8H_{13}NO_5)_n$	$(C_6H_{11}NO_4)_n$
Khối lượng phân tử	$(203,21)_n$	$(161,17)_n$
Hàm lượng nitơ lý thuyết	6,9%	8,7%
Hàm lượng nitơ thực tế	6% – 7%	7% – 8,4%
Khối lượng phân tử trung bình	$3 \times 10^5 - 5 \times 10^5$	$1 \times 10^5 - 3 \times 10^5$
Độ deacetyl hóa	10% – 15%	> 50%
Độ ẩm	< 10%	< 10%
Hàm lượng tro	< 2%	< 1%
Hàm lượng protein	< 0,5%	< 0,3%

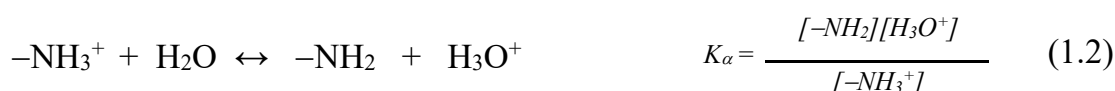
Một thông số rất quan trọng của chitosan là độ deacetyl hóa (ĐĐA%) hoặc độ acetyl hóa (ĐA% = 100 – ĐĐA%). Thực chất là sự khác nhau về hàm lượng của nhóm $-NHCOCH_3$ và nhóm $-NH_2$ trong chitin và chitosan [3]. Sự khác biệt về hàm lượng của các nhóm chức trên dẫn tới sự khác nhau về tính chất của hai loại polymer này. Chitosan có ĐĐA% khác nhau dẫn tới sự khác nhau về khối lượng phân tử (KLPT), độ nhớt, khả năng hòa tan trong axit,.. . Khi deacetyl hóa chitin, do điều kiện khắc khe của quá trình phản ứng deacetyl hóa như nồng độ NaOH, nhiệt độ, thời gian deacetyl,.. dẫn đến sự cắt mạch làm cho chitosan tạo ra có độ dài chuỗi mạch ngắn hơn so với chitin ban đầu. Độ deacetyl càng cao thì KLPT và độ nhớt càng giảm. Độ nhớt của chitosan trong axit acetic bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như ĐĐA%, KLPT, pH, nhiệt độ,.. . Thực vậy, các hằng số về độ nhớt trong phương trình Mark – Houwink là K và a phụ thuộc vào sự thay đổi ĐĐA%. Khi ĐĐA% tăng thì K tăng và a giảm [3, 7].

Chitosan (CTS) khô không có điểm chảy. Khi lưu trữ ở nhiệt độ khoảng 40°C trong một thời gian tương đối dài, khả năng hòa tan và độ nhớt của dung dịch tạo thành bị thay đổi. Sự hiện diện của nhóm amin tự do ($-NH_2$) trong đơn vị D-glucosamine có thể được proton hóa trong môi trường axit, làm cho CTS có thể hòa tan được trong môi trường axit loãng tạo thành dung dịch có pH 4,0 – 6,4 [3].

Hằng số phân ly K_b của nhóm amin đạt được từ cân bằng.



Hằng số thủy phân của axit liên hợp đạt được từ cân bằng.



Khi sự điện ly xảy ra hoàn toàn thì hằng số phân ly của CTS không còn là một đại lượng không đổi mà nó phụ thuộc vào độ phân ly tại thời điểm xác định đó. Sự biến đổi của giá trị pK_a được tính toán theo phương trình Katchalsky [8].

$$pK_a = pH + \log \frac{1 - \alpha}{\alpha} = pK_0 + \frac{\varepsilon \times \Delta\Psi \times \alpha}{K_T} \quad (1.3)$$

Trong đó $\Delta\Psi$ là hiệu điện thế tĩnh điện giữa bề mặt của polyion và dung dịch, α là độ phân ly, K_T là hằng số Boltzman và ε là điện tích electron.

Ngoại suy giá trị pK_a khi cho $\alpha = 1$, tại đó polymer không thay đổi điện tích và do đó hiệu điện thế tĩnh điện bằng không ($\Delta\Psi = 0$). Khi đó ta xác định được giá trị thực của hằng số phân ly là $pK_a = pK_0 = 6,5$, giá trị này độc lập với độ acetyl (ĐA%). Giá trị pK_0 được gọi là giá trị pK_a thực của CTS. Do đó sự hòa tan của CTS phụ thuộc vào độ phân ly và phương pháp deacetyl [3, 8].

Tại pH ~ 3 , sự proton hóa nhóm amin là hoàn toàn và mạch polymer tích điện dương. Khi có mặt những ion đa hóa trị trái dấu như ion sulphat hoặc phosphat, sự tương tác giữa mạch polymer tích điện có thể xảy ra và làm cho độ nhớt của dung dịch tăng lên. Tuy nhiên nếu nồng độ ion trái dấu cao sẽ làm kết tủa CTS. Hầu hết những phản ứng đặc trưng của chitin cũng là những phản ứng đặc trưng của CTS. Ngoài ra, do CTS có nhóm amin bậc 1 hiện diện dọc theo chiều dài mạch phân tử nên làm cho tính chất hóa học của CTS phong phú hơn chitin. Đó là các phản ứng đặc trưng của nhóm amin bậc 1 như: sự hình thành muối, phản ứng khâu mạng, phản ứng tạo chelate,.. nên mở ra nhiều ứng dụng đối với loại polymer này [6, 8].

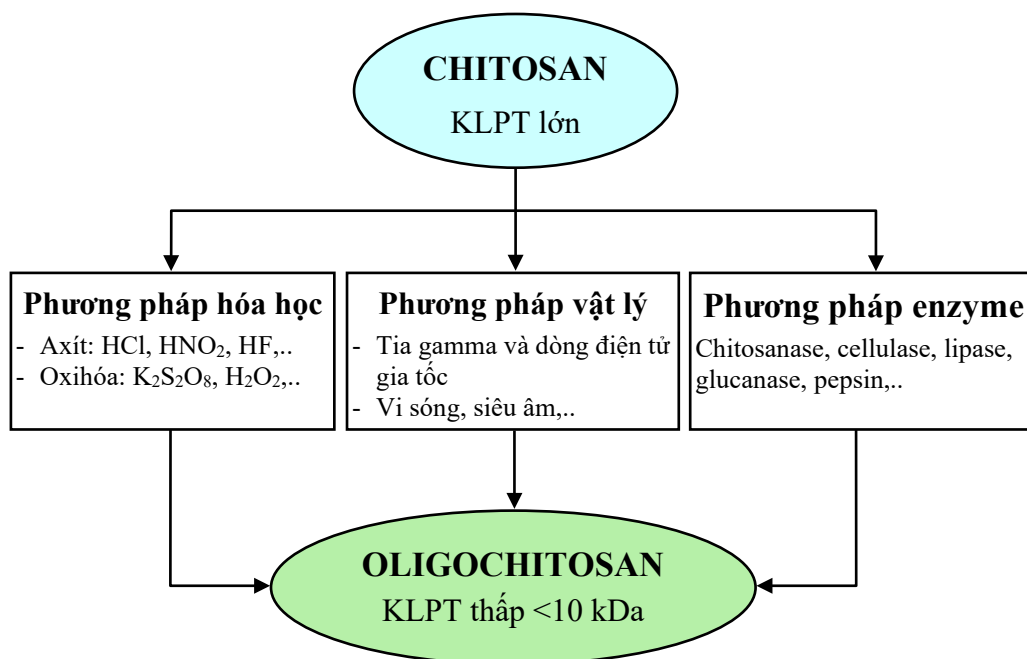
Khi làm khô dung dịch muối chitosan/axít hữu cơ và xử lý nhiệt sẽ thu được dạng màng. Màng này không màu, không mùi, không vị, hòa tan chậm trong nước và trong các dung môi hữu cơ. Hầu hết các màng đều mềm mại, dai, trong suốt, và có độ bền kéo đứt cao. Quá trình xử lý nhiệt để tạo màng có thể làm cho axit của muối bay hơi dẫn đến màng có thể trương trong nước, tuy nhiên trong môi trường axit màng sẽ tan thành dung dịch. Nhóm amin của muối có thể bị dehydrate hóa (khử nước) do ảnh hưởng của quá trình làm khô và xử lý nhiệt để hình thành nhóm amide không tan trong nước và trong axit. Màng CTS có thể trở thành không tan bằng cách xử lý với formaldehyde, acyl chloride, anhydride, muối của kim loại kiềm hoặc amonium của một vài arenesulfonate được alkyl hóa [3, 8].

CTS có khả năng phân hủy sinh học và tương hợp sinh học thu được bằng cách deacetyl hóa một phần chitin. Polymer này ngày càng trở nên phổ biến do có nguồn gốc tự nhiên, các đặc tính hóa lý phù hợp và hoạt tính sinh học đa hướng. Trong nông nghiệp, hy vọng lớn được đặt ra là khả năng sử dụng CTS làm chất kích thích sinh học, sản phẩm bảo vệ thực vật, chất kích thích hoặc tác nhân để tăng tính bảo quản ổn định nguyên liệu thực vật. Các tính chất quan trọng của CTS bao gồm cảm ứng hệ thống phòng vệ thực vật và điều hòa các quá trình trao đổi chất. Ngoài ra, CTS có hoạt tính kháng nấm, kháng khuẩn, kháng vi rút và chống oxi hóa. Hiệu quả tác động của CTS được xác định bởi nguồn gốc, mức độ deacetyl hóa, KLPT, nồng độ và độ hòa tan [5]. Tuy nhiên, CTS tự nhiên thường có KLPT lớn, độ nhớt cao, mức độ hòa tan thấp cũng gây hạn chế phạm vi ứng dụng. Vì vậy, nhiều nghiên cứu tìm giải pháp khắc phục các trở ngại trên đã được thực hiện, trong đó cắt mạch giảm KLPT của CTS chuyển thành dạng oligochitosan được quan tâm chủ yếu.

1.1.2. Oligochitosan và các phương pháp chế tạo

1.1.2.1. Oligochitosan

Không như chitosan, các sản phẩm thủy phân của nó còn được gọi là chitooligosaccharide, chitosan oligomer hay oligochitosan (OC) có độ hòa tan trong môi trường pH trung tính tốt hơn do chuỗi phân tử ngắn, nhiều nhóm amin tự do và độ nhớt thấp. Nói chung, chitosan có KLPT trong khoảng nhỏ hơn 10.000 g/mol (Dalton) được xem là OC [9].



Hình 1.3: Các phương pháp chế tạo oligochitosan phổ biến [9, 10]

OC là một trong số các dẫn xuất của CTS thu hút được nhiều quan tâm nghiên cứu ứng dụng rộng rãi. OC được chế tạo chủ yếu bằng phương pháp hóa học (H_2O_2 , axit mạnh), vật lý (vi sóng, tia tử ngoại, sóng siêu âm, bức xạ gamma Co^{60} , chùm tia điện tử gia tốc,..), enzyme thủy phân (cellulase, chitinase,..), và phương pháp kết hợp (UV + H_2O_2 , chiếu xạ tia gamma Co^{60} kết hợp H_2O_2 ,..). OC nguồn gốc từ chitosan vỏ tôm, cua được chế tạo và phân tích theo mô tả tóm tắt trên [Hình 1.3](#) [10].

1.1.2.2. Chế tạo oligochitosan

a) Cắt mạch bằng phương pháp hóa học

Cắt mạch CTS để chế tạo OC bằng phương pháp hóa học được đánh giá là đơn giản. Tuy nhiên, khối lượng phân tử (KLPT) của sản phẩm OC phân bố rộng (PI lớn), dẫn đến khó phân tách và tinh chế, đồng thời độ deacetyl (ĐĐA%) có thể bị giảm trong trường hợp oxi hóa mạnh. Ngoài ra, phương pháp hóa học thường phải dùng nhiều chất phản ứng hóa học và đòi hỏi phải xử lý lượng tồn dư các chất này.

Các chất hóa học dùng trong phương pháp này để cắt mạch CTS chủ yếu là axit mạnh và chất oxi hóa mạnh. [Jia và cộng sự](#) (2002) sử dụng axit phosphorit 85% để thủy phân CTS tạo chitosan KLPT thấp. Sản phẩm thu được có khả năng hòa tan tốt hơn so CTS ban đầu [11]. [Trombotto và cộng sự](#) (2008) đã báo cáo một phương pháp chế tạo OC bằng phương pháp thủy phân axit gồm nhiều bước: 1) thủy phân CTS trong HCl đậm đặc (~12 M) để thu nhận oligomer KLPT thấp; 2) loại màu dung dịch OC bằng than hoạt tính và loại dư lượng HCl bằng kỹ thuật đồng bay hơi; 3) dung dịch sau thủy phân được siêu lọc qua màng cellulose acetate loại 500 g/mol và sau đó kết tủa bằng ethanol tuyệt đối ở pH được điều chỉnh ~8 – 9 bằng NaOH. Cuối cùng sấy đông khô, thu được lượng OC khoảng 7,5% so với lượng CTS ban đầu [12]. Nhóm nghiên cứu [Tømmerraas và cộng sự](#) (2001) đã nghiên cứu sử dụng axit nitro (HNO_2) để cắt mạch CTS. Kết quả thu được OC với hiệu suất cao, tuy nhiên có sản phẩm phụ độc hại (5-hydroxymethylfurfural) hình thành trong quá trình phản ứng do phản ứng bazơ Schiff giữa các nhóm amino trong phân tử [13].

Hơn nữa, các chất oxi hóa mạnh như natri perborate ($Na_2H_4B_2O_8$), kali persulfate ($K_2S_2O_8$), ozon (O_3), và hydrogen peroxide (H_2O_2) thường được dùng để cắt mạch CTS. Nhóm tác giả [Xia và cộng sự](#) (2013) đã nghiên cứu cắt mạch CTS trong dịch bằng 2% H_2O_2 kết hợp 0,1% axit phosphotungstic ($H_3PW_{12}O_{40}$) ở 65°C. Sản phẩm thu được là OC có độ polymer hóa (DP) 2 – 9 và tăng độ hòa tan, tuy nhiên ĐĐA% của sản phẩm bị suy giảm [14].

Gần đây hơn, [Hai và cộng sự](#) (2019) đã nghiên cứu và chế tạo OC bằng phương

pháp cắt mạch CTS với 1% H₂O₂ trong dung dịch đồng thể. Kết quả nhận được OC có KLPT ~4,5 kDa với cấu trúc hóa học gần như không thay đổi so với CTS ban đầu [9]. Phản ứng cắt mạch xảy ra ở nhiệt độ thường nên giá trị ĐĐA ~90,5% được xác định bằng phương pháp cộng hưởng từ proton (¹H NMR) đối với CTS ban đầu hầu như không thay đổi đối với OC (~89,2%). Các tác giả cũng đưa ra nhận xét là quy trình cắt mạch CTS bằng H₂O₂ ở nhiệt độ thường là thân thiện với môi trường, tiết kiệm năng lượng và có tính khả thi triển khai sản xuất. Tuy nhiên, để nhận được OC thì đòi hỏi thời gian phản ứng diễn ra trong thời gian dài (> 360 giờ). Sản phẩm OC thu được theo phương pháp này cũng thể hiện hiệu ứng kích thích khả năng nảy mầm hạt đậu nành khi xử lý ngâm hạt với dung dịch OC nồng độ ~100 ppm (mg/l).

Xử lý cắt mạch CTS bằng H₂O₂ cũng được các nhóm tác giả nghiên cứu đánh giá là hiệu quả do sản phẩm phân hủy của H₂O₂ là nước và oxy, không gây ô nhiễm môi trường và dư lượng độc hại trong sản phẩm [9, 14].

Cơ chế cắt mạch chitosan bằng H₂O₂ xảy ra do phản ứng của gốc tự do hydroxyl ([•]OH), mà [•]OH được tạo ra từ sự phân ly và phản ứng như sau [9, 15]:



b) Cắt mạch bằng phương pháp enzyme

Phương pháp cắt mạch CTS bằng enzyme thủy phân được đánh giá là dễ thực hiện và dễ kiểm soát hơn so với phương pháp cắt mạch hóa học. Để thủy phân CTS có thể sử dụng nhiều loại enzyme như chitosanase, cellulase, glucanase,...

Mặc dù các sản phẩm thủy phân CTS có KLPT khác nhau có thể được sản xuất bởi nhiều phương pháp, nhưng phương pháp enzyme đang cho thấy được tầm quan trọng, bởi vì enzyme có thể phản ứng đề polymer hóa (cắt mạch) chọn lọc ở điều kiện ôn hòa. Sản phẩm OC thu được không cần các bước tinh chế phức tạp sau đó. Tuy nhiên, phương pháp enzyme cũng có tồn tại nhất định như giá thành sản xuất, khả năng áp dụng quy mô lớn và tính đặc hiệu của các loại enzyme phân cắt [16]. Enzyme thủy phân CTS có thể chia thành hai loại: 1) loại đặc hiệu như chitinase, chitosanase, glucanase,... và 2) loại không đặc hiệu như lysozyme, protease, lipase, amylase, cellulase,... Một loại enzyme ngoại bào của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có hoạt tính chitosanase, thủy phân hiệu quả CTS KLPT ~88 kDa trong dung dịch 1% thành OC có KLPT ~5 kDa trong điều kiện ôn hòa (pH 5,5; 37°C) sau 2 giờ [17].

OC với độ polymer hóa (DP) ~2 – 8 cũng có thể tạo được từ sự thủy phân CTS bằng enzyme α -amylase thương mại. Sản phẩm thu được có hiệu quả kháng khuẩn

cao [18]. Enzyme tái tổ hợp chitinase *LIChi18A* từ vi khuẩn *Lactococcus lactis* cũng đã được sử dụng chế tạo OC từ CTS tế bào nấm [19]. *Sánchez và cộng sự* (2017) đã nghiên cứu cắt mạch CTS bằng enzyme chitosanase từ *Streptomyces griseus* theo quy trình một bước và hai bước. Trong quy trình một bước (CTS hòa tan trong đệm acetate 0,2 M và thủy phân bằng chitosanase), sản phẩm oligomer có ĐĐA 100% thu được chỉ đạt 27%. Trong khi đó, sản phẩm oligomer có ĐĐA 100% chiếm ~63% thu được từ quy trình hai bước gồm: 1) CTS hòa tan trong 0,1 M HCl và thủy phân bằng HNO₂, sau đó kết tủa bằng ethanol/NH₄OH để thu CTS KLPT thấp; và 2) thủy phân CTS KLPT thấp theo quy trình một bước [20]. Ngoài ra, trên cơ sở kết quả nghiên cứu cắt mạch CTS bằng enzyme cho thấy rằng sự thủy phân CTS bằng hỗn hợp các enzyme cho hiệu quả thủy phân cao hơn so với enzyme đơn lẻ. Điển hình kết quả của nhóm tác giả *Xie và cộng sự* (2011) khi sử dụng hỗn hợp các enzyme α -amylase, cellulase và pectinase để thủy phân CTS chỉ trong 2 giờ phản ứng, sản phẩm OC thu được có KLPT ~4 kDa với hiệu suất đạt hơn 90%, sản phẩm OC tan tốt trong nước và gần như không thay đổi cấu trúc hóa học và ĐĐA% [21]. Phương pháp cắt mạch CTS bằng enzyme có tiềm năng để sản xuất OC với cấu trúc hoàn toàn xác định, điều này có ý nghĩa quan trọng đối với việc khám phá hoạt tính sinh học của chúng về mặt cơ học. *Hamer và cộng sự* (2015) đã lựa chọn hai enzyme chitin deacetylase bao gồm COD từ *Vibrio cholera* và NodB từ *Rhizobium* sp. GRH2 để tạo ra các OC có cấu trúc xác định, trong đó hai monomer đầu tiên ở đầu không khử đã được deacetyl hóa [22]. Trên cơ sở kết quả này, có thể gợi ý rằng sản phẩm CTS thủy phân bằng enzyme là phù hợp để nghiên cứu các mối liên hệ giữa cấu trúc và chức năng của OC.

Sử dụng phương pháp enzyme có thể cắt các liên kết glycoside theo chủ đích mà không gây ra phản ứng phụ, thực hiện phản ứng ở nhiệt độ gần nhiệt độ phòng, pH gần trung tính và thu nhận sản phẩm oligomer như mong muốn. Phương pháp này cho phép điều chế các glucosamine oligosaccharide có mức độ polymer hoá thấp, với hiệu suất cao mà không kèm theo việc loại bỏ các nhóm chức amin hay hình thành các hợp chất có màu. Gần đây, *Affes và cộng sự* (2020) sử dụng enzyme chitosanase cắt mạch CTS 1% trong dung dịch axit axetic 1 M, nhiệt độ 50°C với tỷ lệ enzyme/CTS = 70 U/1g trong khoảng thời gian 24 giờ. Kết quả tạo ra một số phân đoạn chitosan KLPT thấp (482, 303, 197, và 163 kDa) và phân đoạn OC nhưng không xác định rõ KLPT, chỉ đưa ra số liệu là KLPT < 4,4 kDa [23].

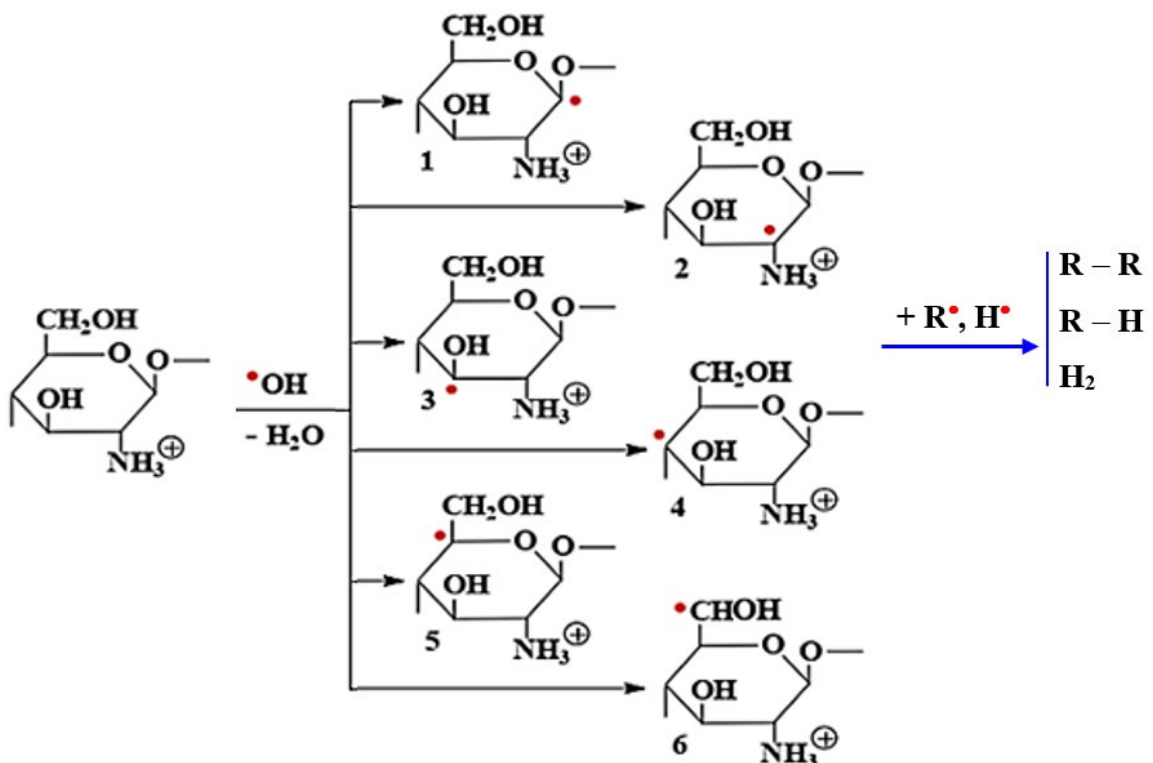
Nhìn chung, phương pháp chế tạo OC bằng enzyme thủy phân đã được sử dụng khá phổ biến, bởi phương pháp này có nhiều ưu điểm như: Hiệu suất thu hồi các phân đoạn có hoạt tính cao; điều kiện diễn ra phản ứng thủy phân nhẹ nhàng, nhiệt độ thấp, pH trung tính nên chi phí thiết bị thấp, không gây ô nhiễm môi trường. Tuy nhiên,

nhược điểm của phương pháp này là chi phí enzyme khá cao và cần phải gia nhiệt dung dịch CTS sau khi cắt mạch để bất hoạt enzyme.

c) Cắt mạch bằng phương pháp bức xạ ion hóa

Cắt mạch CTS bằng các phương pháp vật lý được xác nhận là thân thiện môi trường và sản phẩm thu được thường có độ tinh khiết cao do phản ứng bẻ gãy các liên kết giữa các monomer trong chuỗi phân tử CTS xảy ra dựa vào nguồn năng lượng cao từ bức xạ tia gamma Co^{60} , dòng điện tử gia tốc, tia X, tia tử ngoại,.. [24].

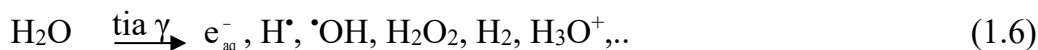
Cắt mạch CTS bằng tia gamma Co^{60} tạo được OC có KLPT nhỏ với hiệu suất và độ tinh khiết cao và duy trì cấu trúc hóa học hay nhóm chức năng của CTS ban đầu [25]. Hơn nữa, tốc độ cắt mạch có thể gia tăng đáng kể bằng sự kết hợp các tác nhân vật lý với sự kiểm soát nhiệt độ hoặc bổ sung tác nhân hóa học như H_2O_2 , HCl , FeSO_4 ,... . Phương pháp chế tạo OC bằng chiếu tia bức xạ ion hóa cắt mạch chitosan là khá hiệu dụng trên quan điểm công nghệ thân thiện với môi trường và khả năng sản xuất quy mô lớn [26]. Mặc dù vậy, để thực hiện phương pháp cắt mạch vật lý trên quy mô lớn đòi hỏi phải trang bị thiết bị chuyên dụng đắt tiền và chi phí năng lượng ảnh hưởng đáng kể đến giá thành sản phẩm. Do vậy, xu hướng hiện nay là xử lý cắt mạch CTS bằng phương pháp kết hợp tia bức xạ năng lượng cao (tia gamma Co^{60} từ nguồn đồng vị Co^{60}) với chất oxy hóa thân thiện môi trường (phổ biến là H_2O_2) để chế tạo OC có KLPT thấp và hoạt tính sinh học cao [26, 27].



Hình 1.4: Sơ đồ phản ứng tách hydro trên phân tử chitosan bởi gốc tự do $\cdot\text{OH}$ [28]

Cơ chế cắt mạch bức xạ đã được [Ulanski và von Sonntag \(2000\)](#) nghiên cứu khá chi tiết. Theo đó, gốc hydroxyl ($\cdot\text{OH}$) tạo ra trong quá trình phân ly bức xạ là tác nhân chính gây ra sự cắt mạch CTS thông qua phản ứng bắt hydro tạo thành gốc tự do đại phân tử (R^{\cdot}) ([Hình 1.4](#)). Các gốc R^{\cdot} sau quá trình chuyển vị và tái kết hợp tạo thành CTS có KLPT thấp hoặc là OC [[28](#)].

Hiệu ứng đồng vận (synergistic effect) giữa H_2O_2 với tia bức xạ gamma Co^{60} trong phản ứng cắt mạch CTS đã được một số công trình nghiên cứu trước đây ghi nhận [[26, 27, 29](#)]. Bổ sung lượng nhỏ H_2O_2 ($< 2\%$) vào dung dịch CTS đã làm giảm đáng kể liều xạ cần thiết để cắt mạch CTS tạo OC, điều này rất có ý nghĩa trong việc tiết kiệm chi phí sản xuất. Nguyên nhân là do sự tạo thành và bổ sung gốc $\cdot\text{OH}$ khi phân ly bức xạ nước và H_2O_2 như sau [[26, 27](#)]:



Trong quá trình chiếu xạ e_{aq}^- và H^{\cdot} có thể phản ứng với H_2O_2 như sau:



Chi phí chế tạo OC bằng phương pháp enzyme thông thường cao hơn so với phương pháp cắt mạch hóa học [[30](#)]. Tuy nhiên, phương pháp hóa học cũng có nhược điểm là làm thay đổi cấu trúc của chitosan do tạo nhóm chức carboxyl, phân hủy nhóm $-\text{NH}_2$ và thậm chí là phá vỡ vòng glucoside [[31](#)]. Hơn nữa, phương pháp hóa học còn có hạn chế về hiệu suất tạo OC thấp và có nguy cơ gây ô nhiễm môi trường [[24](#)].

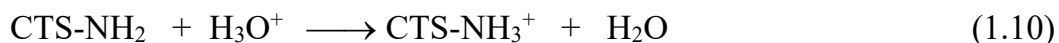
Còn đối với phương pháp bức xạ ion hóa để cắt mạch CTS có ưu điểm nổi bật là xử lý cắt mạch CTS ở nhiều trạng thái (dạng bột, dạng huyền phù, và dung dịch) mà phương pháp enzyme hoặc hóa học khó thực hiện được để tạo OC. Tuy nhiên, phương pháp này thường phải cần liều xạ cao và điều đó không thuận lợi để ứng dụng sản xuất lượng lớn. Do vậy phương pháp cắt mạch CTS bằng hiệu ứng đồng vận giữa chiếu xạ tia gamma Co^{60} với H_2O_2 được xem là giải pháp có ý nghĩa khoa học và thực tiễn. Theo kết quả nghiên cứu của [Duy và cộng sự \(2011\)](#) và [Hien và cộng sự \(2012\)](#) về hiệu ứng đồng vận của bức xạ tia gamma Co^{60} và H_2O_2 để cắt mạch dung dịch β -chitosan 5% thì liều xạ chỉ khoảng < 16 kGy đã nhận được OC với KLPT < 10.000 Da [[26, 27](#)]. Như vậy sử dụng hiệu ứng đồng vận (H_2O_2 và tia gamma Co^{60}) đã giảm liều xạ chế tạo OC đáng kể và điều này góp phần làm giảm giá thành sản phẩm.

OC hoạt động như là một loại chất kích thích sinh học (biostimulant) gồm tăng trưởng, đề kháng [32] và là vắc xin thực vật đã được minh chứng trên nhiều loại cây trồng [33]. Gần đây, *Ahmed và cộng sự* (2020) đã trình bày tổng quan về OC, trong đó đã nêu ra một số tính chất sinh học đặc thù của OC như: hoạt tính kháng khuẩn, hoạt tính chống khối u/ung thư, hoạt tính chống oxi hóa, hoạt tính gia tăng miễn dịch,.. đặc biệt đề cập đến khả năng ứng dụng OC làm chất tăng trưởng, kích kháng và phòng trừ bệnh cho cây trồng; và đánh giá tiềm năng ứng dụng trong phát triển nông nghiệp bền vững, giảm thiểu và khả năng thay thế sử dụng các loại nông dược độc hại trong việc phòng và trị bệnh cho cây trồng [34]. Đồng thời, đã có những công trình công bố kết quả hoạt tính sinh học của CTS và OC được cải thiện đáng kể khi kết hợp với các ion kim loại ở dạng phức [35-38].

1.2. Chế tạo phức oligochitosan-Zn²⁺

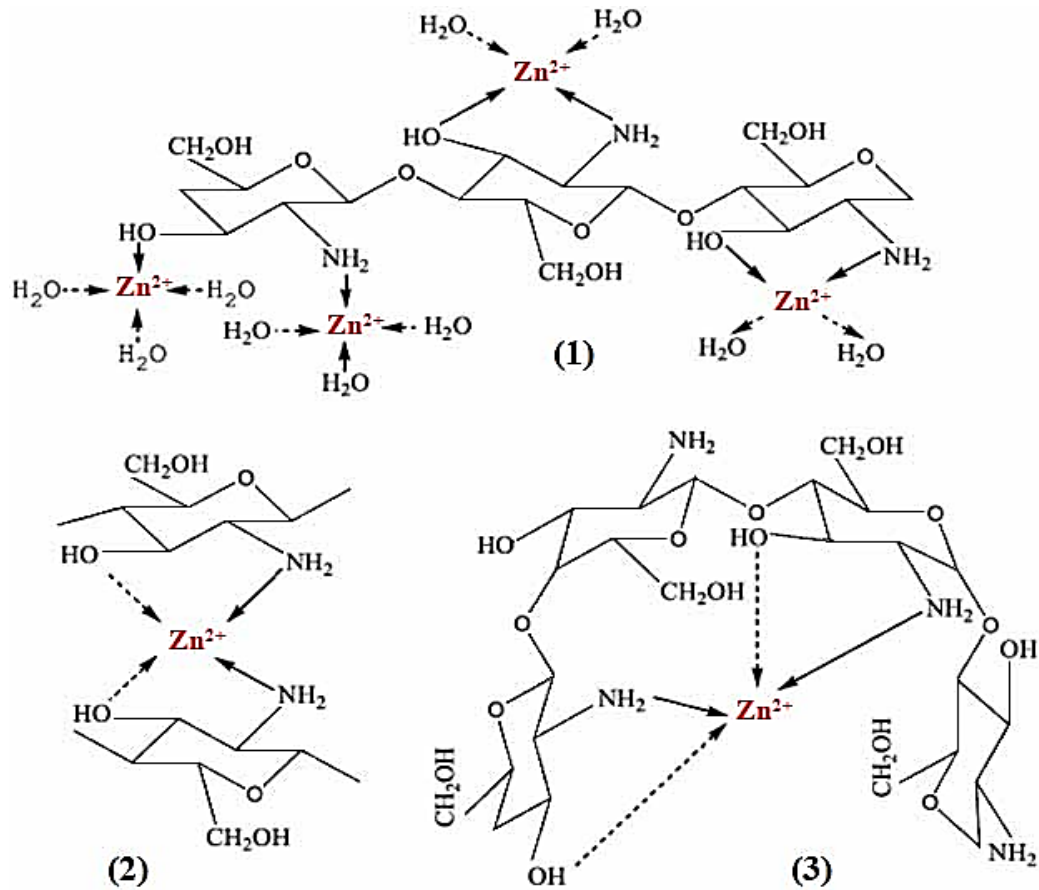
Cũng như những phức chitosan-ion kim loại khác, phức oligochitosan-Zn²⁺ (OC-Zn²⁺) được chế tạo theo phương pháp khuấy trộn giữa dung dịch OC với muối kẽm [35]. Trên phân tử chitosan (CTS) hoặc OC mang các nhóm chức -NH₂, -OH linh động và ái lực cao với ion kim loại nên dễ dàng tạo phức với ion kim loại trong đó có Zn²⁺ [36-38]. Dung lượng hấp phụ cao từ 14 – 118 mg Zn²⁺/g CTS tùy thuộc vào nồng độ kẽm [39]. Phản ứng tạo phức chịu ảnh hưởng chủ yếu là pH môi trường, pH thích hợp trong khoảng 4,5 – 6,5 [39, 40].

Cơ chế tạo phức theo thuyết axit – bazơ Lewis, trong đó CTS hoặc OC là một bazơ do cho cặp điện tử, ngược lại Zn²⁺ được xem là một axit do nhận cặp điện tử để liên kết phối trí tạo phức. Phản ứng được tóm tắt như sau [36, 39, 40]:



Khi Zn²⁺ tương tác với CTS hay OC, tùy thuộc vào tỷ lệ phân mol của Zn²⁺ với -NH₂ sẽ tạo ra cấu trúc phức theo kiểu treo (pendant pattern – các ion Zn²⁺ liên kết với một nhóm -NH₂) và kiểu cầu nối (bridge pattern – các ion Zn²⁺ liên kết với nhiều nhóm -NH₂ và -OH của cùng chuỗi hoặc khác chuỗi CTS. Trên cơ sở nghiên cứu phức CTS-Zn²⁺ với tỷ lệ mol R = Zn²⁺/-NH₂ từ 1/4 đến 4/1, *Wang và cộng sự* (2004) đã đề xuất 3 kiểu cấu trúc phức CTS-Zn²⁺ như trình bày trên Hình 1.5 [36].

Gần đây hơn, bằng kỹ thuật phân tích phổ FTIR của phức CTS-ion kim loại (Cu²⁺ và Zn²⁺) tác giả *Rogina và cộng sự* (2019) [38] đã gợi ý các tương tác phối trí giữa ion kim loại với các đơn vị monomer trong phân tử CTS như Hình 1.6.



Hình 1.5: Kiểu cấu trúc phức chitosan-Zn²⁺ hay oligochitosan-Zn²⁺ [36, 39]

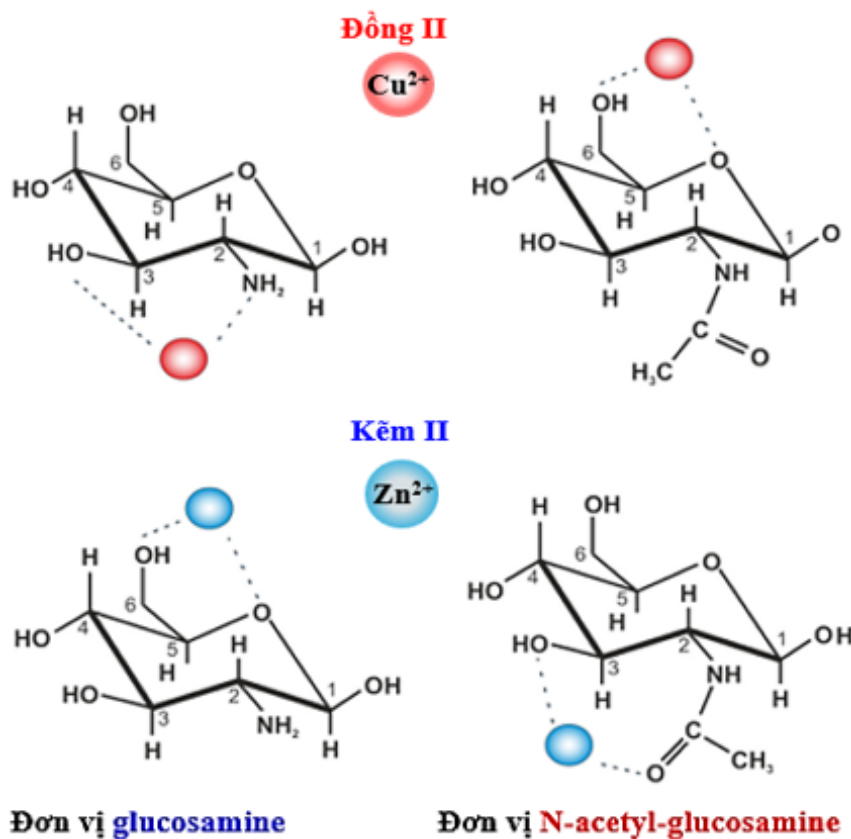
1- kiểu treo; 2- kiểu cầu nối trên các chuỗi mạch khác nhau; và 3- kiểu cầu nối trên cùng chuỗi mạch phân tử CTS hoặc OC.

Kết quả chế tạo phức CTS-Cu²⁺ của *Rhazi và cộng sự* (2002) cho thấy, trong môi trường axit pH < 5,3 thì sự tạo phức không xảy ra. Trong khoảng pH cao hơn, sự tạo phức đã xảy ra thông qua liên kết phối trí giữa nhóm amin của CTS với Cu²⁺. Hơn nữa khi tăng pH, màu của dung dịch phức CTS-Cu²⁺ chuyển từ màu xanh nhạt sang tím đậm. Khi pH ~9, dung dịch phức CTS-Cu²⁺ trở nên đặc hơn. Điều này có thể là do kết tủa của đồng hydroxide hoặc là CTS tự kết tủa. Điểm pH kết tủa của dung dịch CTS là ~6,5, nhưng khi tạo phức với Cu²⁺, CTS kết tủa ở pH cao hơn ~7,7 [41].

Phân tích giản đồ XRD của phức CTS với ion kim loại thấy rằng, hai đỉnh đặc trưng của CTS xuất hiện với cường độ thấp hoặc biến mất, trong khi có đỉnh nhiễu xạ mới xuất hiện. Kết quả này chứng tỏ rằng có sự tạo thành pha kết tinh mới và điều này cũng giải thích nguyên nhân tại sao các đỉnh nhiễu xạ của CTS biến mất là do liên kết hydro trong cấu trúc của CTS bị phá hủy bởi các ion kim loại tạo phức (chelate) với nhóm -NH₂ và -OH. Sự giảm mật độ liên kết hydro dẫn tới sự giãn các chuỗi mạch CTS, và cuối cùng là giảm sự tập hợp của các phân tử CTS [42].

Khi tạo phức với Zn²⁺, một số đặc trưng tính chất sinh hóa của CTS thay đổi

như là thay đổi trạng thái kết tinh và tính phân hủy sinh học của CTS [35, 38], gia tăng hoạt lực kháng khuẩn, kháng nấm của CTS [36, 37].



Hình 1.6: Các liên kết phối trí giữa ion kim loại (Cu^{2+} , Zn^{2+}) với các đơn vị cấu trúc của chitosan [38]

Ngoài ra, Zn^{2+} ions được đánh giá là rất quan trọng và cần thiết cho nhu cầu dinh dưỡng của người và động vật [36]. Theo Back (2003), thiếu hụt kẽm đã làm cho trẻ em gia tăng nguy cơ nhiễm bệnh và tử vong, hiện tượng khá phổ biến ở các nước có thu nhập thấp [43]. Hơn nữa, khi sử dụng phức CTS- Zn^{2+} đối với cây trồng cụ thể là cây ngô, không những gia tăng khả năng phòng trừ bệnh mà còn làm gia tăng năng suất hạt ngô từ 20 – 40%, đồng thời hàm lượng kẽm vi lượng trong hạt ngô cũng gia tăng từ ~41,3 $\mu\text{g/g}$ (đối chứng) lên 62,2 $\mu\text{g/g}$ hạt ngô khô [44]. Chính vì vậy việc chế tạo phức CTS- Zn^{2+} , hoặc OC- Zn^{2+} dùng trong nông nghiệp là rất triển vọng, và đặc biệt có thể dùng bổ sung kẽm vi lượng cho người và vật nuôi.

1.3. Hiệu ứng phòng trừ bệnh thực vật của oligochitosan, Zn^{2+} và phức oligochitosan- Zn^{2+}

1.3.1. Hiệu ứng phòng trừ bệnh của oligochitosan

Hiệu quả phòng trừ bệnh cho cây trồng, đặc biệt là các mầm bệnh nguồn gốc

vi sinh vật, của các hoạt chất thường được thể hiện qua hai phương thức: 1) tác động trực tiếp lên tế bào vi sinh vật, gây ức chế tăng sinh hoặc tiêu diệt mầm bệnh; 2) tác động gián tiếp thông qua kích hoạt hệ thống phòng vệ trong cơ thể thực vật, tăng sinh tổng hợp các thành phần tham gia kháng bệnh [34, 45]. Hiện tượng kích kháng bệnh ở thực vật đã được nghiên cứu từ những năm đầu thế kỷ 20. Một trong những nghiên cứu tiên phong được công bố vào năm 1940 về khả năng tự kháng nấm *Phytophthora infestans* của củ khoai tây sau khi gây nhiễm với nấm *P. infestans* (loại này đã bắt hoạt khả năng gây bệnh) [44]. Những kết quả nghiên cứu tiếp theo trên các cây trồng khác đã khẳng định hiện tượng đáp ứng phản vệ tự kháng bệnh ở thực vật [44].

Không như động vật, giới thực vật đa số không có khả năng di chuyển nên chúng phải phát triển những cơ chế thích ứng tinh vi với các tác động bất lợi từ môi trường sống bao gồm: yếu tố sinh học (biotic) như là sự tấn công của côn trùng, vi khuẩn, vi rút, vi nấm; và yếu tố phi sinh học (abiotic) như là bị sây sát, nhiễm mặn, khô hạn, rét buốt,.. [44]. Để chống chọi với các yếu tố gây bất lợi, thực vật đã phát triển khả năng khơi mào hệ thống các phản ứng đáp ứng phản vệ hay còn gọi là hệ miễn dịch tự nhiên và miễn dịch hệ thống như là đáp ứng siêu mẫn cảm, tạo kháng thể (phytoalexin), protein kháng bệnh, gia cường khả năng chống chịu,.. [33].

Khi thực vật tương tác với mầm bệnh, hệ thống nhận biết các tác nhân kích thích của tế bào thực vật kích hoạt hệ thống sinh tổng hợp các hoạt chất có tính năng tiêu diệt mầm bệnh. Các tác nhân gây đáp ứng sinh tổng hợp chất kháng bệnh được gọi là chất kích kháng (elicitor) hay là kháng nguyên và các chất do tế bào thực vật tổng hợp để tiêu diệt mầm bệnh được gọi là chất kháng bệnh (phytoalexin) hay là kháng thể [46]. Chất kích kháng thực vật rất đa dạng, bao gồm chất hữu cơ, vô cơ và phức hữu cơ với ion kim loại [46]. Trong đó, chất kích kháng được tách chiết phân lập từ vi sinh vật, động vật và thực vật được xem là chất kích kháng sinh học (biotic elicitor). Nhiều chất kích kháng sinh học được chiết xuất từ nấm bệnh như là oligosaccharide, glycoprotein, peptid, phospholipid đã được minh chứng có hiệu quả kích kháng bệnh cho cây trồng [47].

Chitin và chitosan được xếp vào loại chất kích kháng ngoại bào (exogenous elicitor) có hoạt tính kích kháng bệnh hiệu quả cao. Chitin và chitosan là nguồn polysaccharide tự nhiên có trữ lượng lớn ~10 tỷ tấn/năm, mang nhiều hoạt tính sinh học quý giá khác đã được nghiên cứu ứng dụng trong nhiều lĩnh vực [45, 48].

Cho đến thời điểm gần đây, cơ chế hoạt động kích kháng bệnh của CTS hoặc OC cũng chưa được làm sáng tỏ một cách đầy đủ. Tuy nhiên, theo kết quả thông tin tổng quan của một số nhóm các nhà khoa học đã cho thấy rằng chitin/chitosan hoặc

các dẫn xuất oligomer của chúng đã kích thích thực vật tạo nhiều phản ứng đáp ứng phản vệ theo một số con đường sau đây [33, 34]:

Các thụ thể đặc hiệu nằm trên màng tế bào thực vật: khi xử lý thực vật với các polysaccharide trên cơ sở chitin/chitosan thì trong cây sẽ kích hoạt hệ thống phản vệ. Tế bào thực vật nhận diện tín hiệu kích thích từ chitin/chitosan cũng tương tự như tín hiệu từ vi sinh vật do chúng cũng chứa thành phần polysaccharide này. Một protein thụ thể của chitin/chitosan là CEBiP đã được phân lập trên nhiều loại cây trồng khác nhau. Ngoài ra một số glycoprotein thuộc họ lectin (thụ thể CTS) trên màng tế bào thực vật có tính năng liên kết đặc hiệu với dẫn xuất CTS để tạo ra dòng thác truyền tín hiệu gây biểu hiện gen và sinh tổng hợp các sản phẩm ức chế mầm bệnh.

Chitin/chitosan và các dẫn xuất của chúng kích thích thực vật đáp ứng phòng vệ thông qua hiệu ứng gia tăng sinh tổng hợp các phytoalexin; protein thủy giải liên quan mầm bệnh (PR-protein) như là glucanase, chitinase,...; chất ức chế proteinase; hình thành các callose; lignin hóa; và hoạt hóa gen đáp ứng điều kiện bất lợi. Chitin/chitosan và các dẫn xuất của nó kích thích thực vật tăng sinh tổng hợp các chất thứ cấp có khả năng truyền tín hiệu hệ thống như H_2O_2 , ROS, NO, phytohormon,... . Phun cây trồng với CTS có KLPT ~5 kDa (OC) đã gia tăng đáng kể phytoalexin, enzyme chitinase, glucanase, ROS, thành phần sterol, phenol,.. để đáp ứng phản vệ hệ thống. Tổng quan cơ chế kích kháng bệnh cho cây trồng được nhóm tác giả [Xing và cộng sự](#) (2015) tóm lược như sau [49]:

+ Kích thích sinh tổng hợp PR-protein: Đây là những hợp phần, các protein, các đoạn peptid KLPT thấp có hoạt tính kháng khuẩn cao. Một số enzyme quan trọng thuộc PR-protein và được xem như là dấu hiệu điển hình (marker) của hiện tượng kích kháng bệnh đó là glucanase, chitinase. Các enzyme này có hoạt tính thủy phân các polysaccharide đặc trưng trên màng tế bào vi sinh vật, còn đối với tế bào thực vật thì không phải là cơ chất của nó. Do đó trong tế bào thực vật, các enzyme này tồn tại như một tác nhân phòng vệ đặc biệt.

+ Kích thích sinh tổng hợp các enzyme liên quan phản vệ (DR-enzyme): Chitin/chitosan là chất kích kháng ngoại bào, có khả năng kích thích thực vật sản sinh nhiều enzyme có vai trò gia cường sức kháng bệnh như phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase, polyphenol oxidase, catalase, and superoxide dismutase,... . Các enzyme này tham gia điều hòa các quá trình sinh hóa trong tế bào thực vật.

+ Kích thích sự tích lũy các hoạt chất trao đổi chất thứ cấp liên quan phản vệ (DR-secondary metabolite): Các hoạt chất này không trực tiếp liên quan đến sự sinh trưởng và phát triển nhưng thường liên quan đến khả năng kháng bệnh của cây trồng.

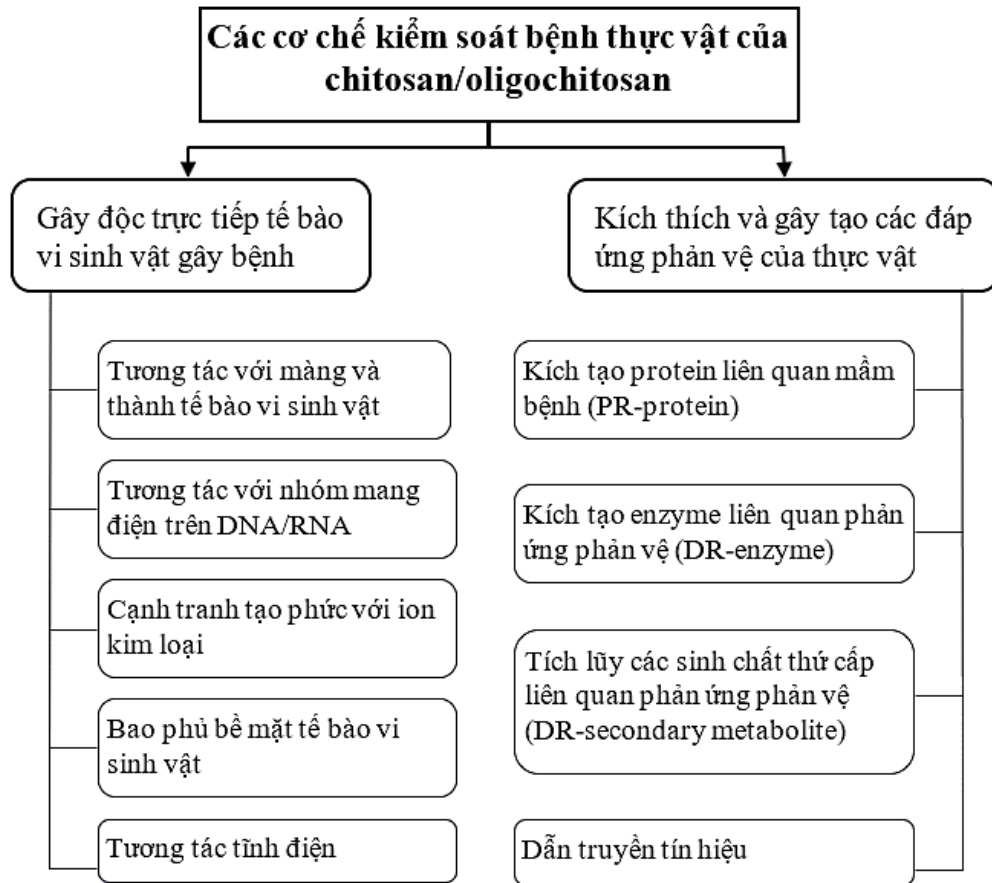
Khi được xử lý với chitin/chitosan và các dẫn xuất của chúng thì cây trồng sẽ kích thích sinh tổng hợp các phytoalexin (terpenoids, isoflavonoid, alkaloids,..) có hiệu ứng chống oxi hóa và kháng nấm bệnh hiệu quả; kích thích quá trình lignin hóa để gia cường tính bền vững tế bào; gia tăng sự bần hóa tế bào (suberization); gia tăng hàm lượng phenol (thành phần hoạt tính chống oxi hóa, kháng vi sinh vật gây bệnh và yếu tố trung gian cho các con đường sinh tổng hợp khác); gia tăng thành phần callose (thành phần gia cố cho thành tế bào thực vật, đóng vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn sự tấn công của mầm bệnh và giảm mức độ sâu sát).

+ Kích thích dẫn truyền tín hiệu: Cũng như các tác nhân kích kháng khác, chitin/chitosan và các dẫn xuất của chúng cũng tạo ra những dẫn truyền tín hiệu như: 1) tiếp nhận tín hiệu ngoại bào thông qua các thụ thể đặc hiệu trên màng tế bào thực vật như là thụ thể kinase 2 (CERK1), thụ thể thuộc họ lectin; 2) tiếp nhận tín hiệu nội bào, khi CTS thâm nhập vào trong tế bào thực vật sẽ cạnh tranh với protein histone tương tác với DNA dẫn đến thay đổi nhiều con đường sinh hóa tế bào; và 3) truyền tín hiệu thông qua các phân tử tín hiệu trung gian khác, chitin/chitosan có hiệu ứng kích thích dẫn truyền và khuếch đại tín hiệu trong tế bào thông qua các chất truyền tin như tác nhân oxi hóa mạnh (ROS), Ca^{2+} , NO, etylen, jasmonic axit, salicylic axit, abscisic axit được gọi là con đường truyền tín hiệu qua trung gian CTS [49].

Bên cạnh hoạt động kích kháng, thì hiệu quả kiểm soát bệnh trên thực vật còn thông qua hiệu ứng kháng bệnh trực tiếp [34]. Tuy nhiên, cơ chế hoạt động kháng khuẩn, kháng nấm của CTS và OC vẫn chưa được làm sáng tỏ hoàn toàn, nhưng nhiều tài liệu nghiên cứu chỉ ra rằng nó có thể liên quan nhiều đến bản chất polycation của chúng. Sự tương tác giữa CTS hoặc OC với các phân tử tích điện âm trên bề mặt tế bào vi sinh vật dẫn đến sự ngưng kết thành tế bào, làm ly giải các thành phần nội bào và gây chết tế bào. Một giả thuyết khác cho rằng CTS hạn chế sự xâm nhập của mầm bệnh vào tế bào thực vật bằng cách giảm sự mở khí khổng. Đồng thời, hoạt động kháng nấm của CTS được biểu hiện qua khả năng liên kết và ức chế quá trình tổng hợp độc tố của vi sinh vật; và mức độ kích thích hệ thống kháng bệnh ở thực vật sản xuất nhiều chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính diệt khuẩn và nấm bệnh [45]. Ví dụ như: phytoalexin, axit abscisic, methyl jasmonate và các hợp chất phenolic, và các enzyme như β -glucanase, chitinase phân hủy mầm bệnh.

Ngoài ra, các nghiên cứu khác cũng đã chỉ ra rằng CTS hay OC gây nên những thay đổi về hình thái trong tế bào nấm ở các giai đoạn phát triển khác nhau. Các polymer này còn có tính năng củng cố thành tế bào thực vật và tạo một hàng rào cơ học hạn chế sự tiếp xúc của thực vật với các yếu tố bất lợi bên ngoài. Do đó, hiệu quả của hoạt động chống lại vi sinh vật gây bệnh của CTS hay OC có liên quan đến hoạt

động hai hướng: kiểm soát trực tiếp mầm bệnh và gây tạo các đáp ứng bảo vệ thực vật [5] như tóm tắt trên [Hình 1.7](#).



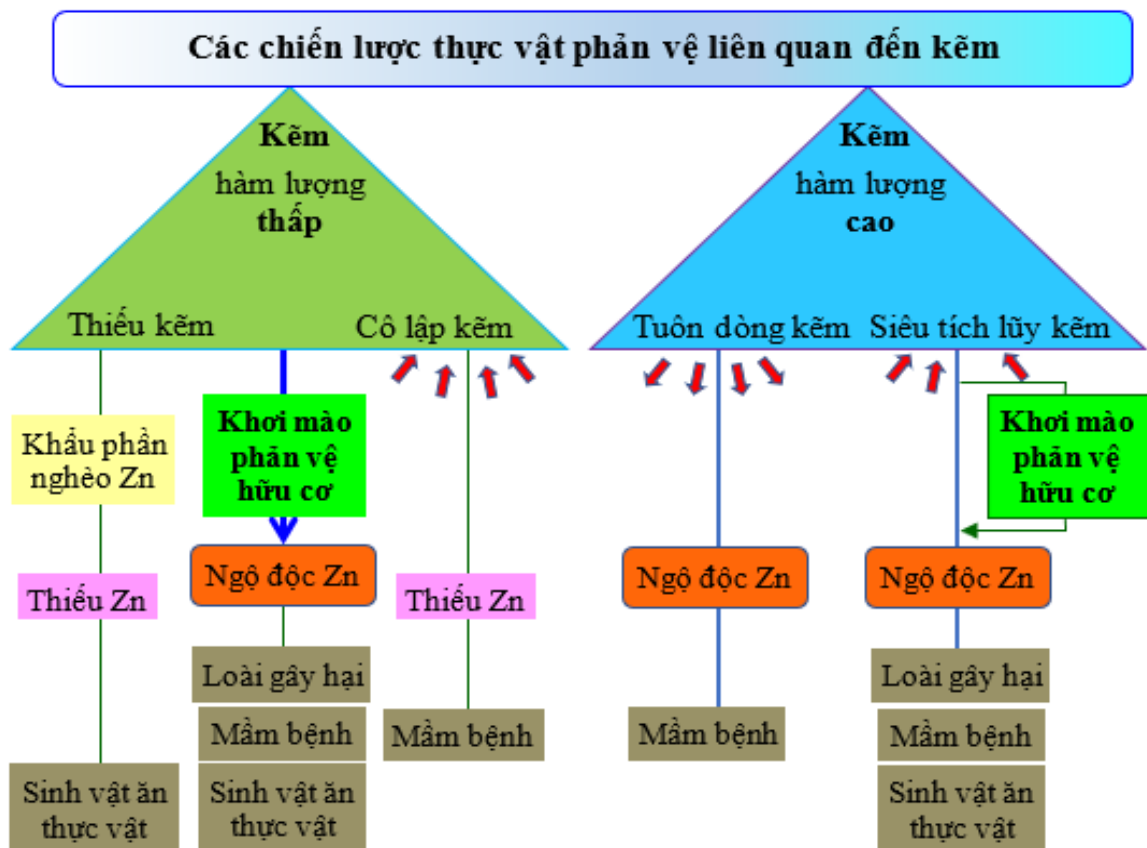
Hình 1.7: Hoạt động kiểm soát và kích kháng bệnh thực vật của chitosan/oligochitosan [45]

Ngoài ra, CTS và OC được minh chứng có hoạt tính kích thích tăng trưởng và tạo ra các phản ứng liên quan đến cả chuyển hóa sơ cấp và thứ cấp ở thực vật. CTS và OC kích thích tăng cường quang hợp bằng cách khuếch đại hoạt động của các enzyme chuyển hóa carbon, nitơ và các enzyme tham gia phản ứng sáng và tối của quang hợp. Chúng đóng vai trò quan trọng trong việc kích thích bộ máy quang hợp bằng cách điều chỉnh quá trình quang hóa sơ cấp. Chúng cũng khắc phục những hạn chế của khí khổng và khuếch đại hiệu quả cố định carbon trong các phản ứng tối và thúc đẩy tổng hợp carbohydrate. CTS và các OC kích thích các enzyme và làm tăng hàm lượng các chất chuyển hóa thứ cấp. Điều này có thể giải thích là CTS và các OC đóng vai trò là phối tử thích hợp với các thụ thể, tạo nên các dẫn truyền tín hiệu khác nhau, chẳng hạn như truyền qua đường GPCR và PLC/PKC, MAPK, H₂O₂, kích thích các yếu tố phiên mã trong cây tạo ra phản ứng tối đa có thể. CTS và các OC cũng thể hiện các hoạt động kháng khuẩn và hoạt động như thuốc trừ sâu sinh học, ngăn chặn sự phát triển của mầm bệnh và duy trì năng suất và chất lượng cây trồng [34].

Như vậy, kiểm soát bệnh thực vật bằng phương cách gây kích kháng bệnh là một giải pháp hiệu quả, vừa đảm bảo năng suất và vừa tránh tác động xấu cho môi trường sinh thái. Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu chuyên sâu nhưng cơ chế hoạt động kích thích tăng trưởng và kích kháng bệnh thực vật của chitin/chitosan cũng như các dẫn xuất của polysaccharide này vẫn tồn tại nhiều điểm chưa được làm sáng tỏ. Tuy nhiên, từ các công trình nghiên cứu liên quan đã gợi ý rằng cải biến thích hợp đối với chitin/chitosan sẽ làm gia tăng hoạt tính kháng khuẩn, cải thiện các đặc trưng lý hóa, và tạo cho các hoạt chất sinh học này phù hợp để ứng dụng quy mô lớn [50, 51].

1.3.2. Hiệu ứng phòng trừ bệnh của Zn^{2+}

Vai trò vi lượng trong hệ thống phòng vệ thực vật đã được đề cập chủ yếu đối với Mn, Cu, Fe, và Zn. Kẽm dường như đóng vai trò chính trong cả phản ứng miễn dịch của động vật và thực vật. Kẽm là một đồng yếu tố (cofactor) của hàng trăm protein cấu trúc và enzyme xúc tác, và có các chức năng cấu trúc chính trong các tâm protein tương tác với các phân tử khác. Điển hình là protein ngón tay kẽm (Zn finger) làm trung gian liên kết DNA của các yếu tố phiên mã và tương tác protein-protein. Lượng protein chứa kẽm có thể chiếm khoảng 9% toàn bộ hệ protein ở sinh vật nhân thực và từ 5% đến 6% ở sinh vật nhân sơ [52].



Hình 1.8: Cơ chế kẽm kích thích phản vệ ở cây trồng [53]

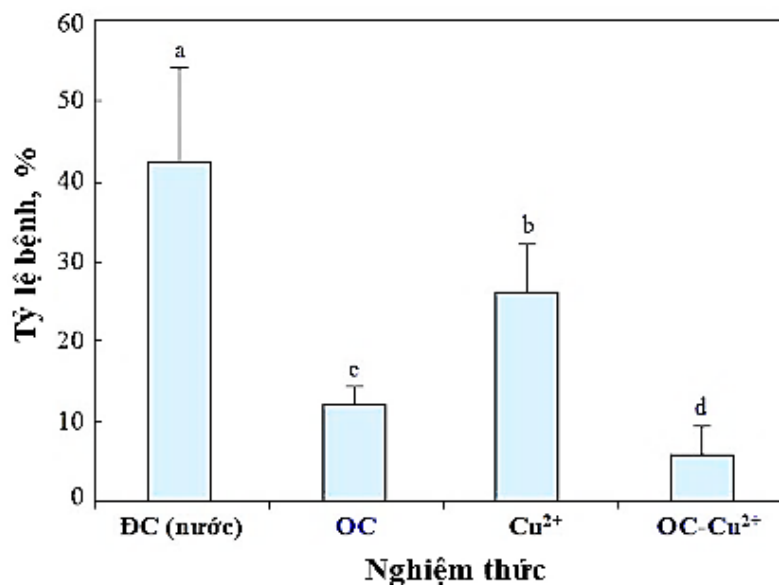
Kẽm đóng vai trò then chốt trong phản ứng phòng trừ bệnh của cây trồng đối với mầm bệnh vi sinh vật. Tuy nhiên, các cơ chế liên quan đến đáp ứng phản vệ của kẽm ở thực vật rất khác nhau. Tại nồng độ kẽm bảo vệ chống lại một số mầm bệnh nhất định nào đó cũng có thể gây ra tính miễn cảm cao hơn đối với mầm bệnh khác trên cùng một cây trồng. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng, trong hầu hết các trường hợp, bón kẽm làm giảm các triệu chứng nhiễm bệnh của cây trồng. Protein Zn đóng vai trò kép trong bảo vệ thực vật, với khả năng đồng thời hỗ trợ cho cây trồng và ức chế mầm bệnh thâm nhập.

Các con đường ức chế mầm bệnh và kích kháng bệnh cho cây trồng (Hình 1.8) được tóm tắt như sau [53-55]: Cạnh tranh nguồn kẽm, gây độc trực tiếp cho nấm bệnh; và kích hoạt cây trồng sinh tổng hợp protein kháng bệnh.

1.3.3. Hiệu ứng phòng trừ bệnh của phức oligochitosan- M^{2+}

Cho đến nay, thông tin liên quan đến hiệu ứng phòng trừ bệnh trên cây trồng của phức OC-ion kim loại còn khá hiếm.

Aziz và cộng sự (2006) nghiên cứu về hiệu ứng kích kháng bệnh đốm trắng (downy mildew) trên lá cây nho do nấm *Plasmopara viticola* gây ra bằng xử lý phun qua lá OC (KLPT 1,5 kDa) nồng độ 200 mg/l kết hợp và không kết hợp với $CuSO_4$ hàm lượng 50 mg/l, trước khi cho nhiễm bệnh. Kết quả Hình 1.9 cho thấy tỷ lệ nhiễm bệnh thấp nhất là 5% đối với lô phun phức OC- Cu^{2+} so với ~12%, ~27% và ~42% tương ứng đối với lô phun OC, $CuSO_4$ và đối chứng (phun nước) [56].



Hình 1.9: Tỷ lệ bệnh đốm trắng trên lá cây nho xử lý OC, Cu^{2+} , và phức OC- Cu^{2+}

Phức OC- Zn^{2+} có hiệu quả phòng trừ bệnh cao đối với thực vật do phức được

tạo nên từ hai thành phần cùng có khả năng kháng vi sinh vật và kích thích hệ thống phản vệ của cây trồng [37, 38, 44]. Đồng thời, ở dạng phức không những hoạt tính của OC và của Zn^{2+} được gia tăng mà còn tăng hiệu quả sử dụng kẽm, góp phần giảm thiểu lượng kẽm ly giải ra môi trường [38, 44].

Hơn nữa, điều kiện chế tạo các phức chất này khá giản tiện, đặc biệt là sử dụng OC chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma Co^{60} . Do vậy, sản phẩm phức OC-ion kim loại (Cu^{2+} , Zn^{2+}) rất triển vọng ứng dụng thực tế để phát triển sản xuất nông nghiệp bền vững [38, 56]. Sử dụng sản phẩm phức OC-ion kim loại có tiềm năng thay thế hoặc là giảm thiểu sử dụng nông dược độc hại, đáp ứng nhu cầu bảo vệ môi trường, gia tăng sản lượng và chất lượng nông phẩm, mang lại hiệu quả kinh tế cho ngành nông nghiệp.

1.4. Chitinase trong hệ thống phòng bệnh cây trồng

Thực vật được trang bị nhiều cơ chế phòng vệ để tự bảo vệ mình trước sự tấn công của mầm bệnh. Khi tương tác giữa thực vật và mầm bệnh tạo ra nhiều cơ chế bảo vệ bao gồm: gia cường thành tế bào, tăng sản xuất mới các hợp chất chống vi sinh gây bệnh (protein liên quan mầm bệnh PR-protein và các chất chuyển hóa thứ cấp) và gây chết tế bào cục bộ nhanh chóng (hypersensitive),... Trong số đó, các PR-protein là enzyme glucanase và chitinase có vai trò rất quan trọng vì chúng tấn công tiêu diệt trực tiếp tế bào nấm và côn trùng gây hại [57].

Enzyme chitinase (EC 3.2.1.14) xúc tác thủy phân chitin, chitosan, lipochitooligosaccharide, peptidoglycan, glycoprotein chứa N-acetyl-glucosamine. Đây là các thành phần đặc trưng cấu tạo màng ở vi sinh vật. Chitinase được coi là có vai trò bảo vệ hoặc tăng cường khả năng chống bệnh ở thực vật và động vật bậc cao không chứa chitin. Ở thực vật, chitinase có liên quan đến cả phản ứng đáp ứng các yếu tố sinh học và phi sinh học trong quá trình sinh trưởng, phát triển. Các phân tích về trình tự gen cho thấy các gen mã hóa chitinase được đại diện bởi các họ lớn và các gen thành viên riêng lẻ, và được biểu hiện trong các điều kiện khác nhau. Các enzyme chitinase là thành viên trong nhóm các protein liên quan đến sinh bệnh học được tạo ra số lượng lớn khi tế bào thực vật bị tấn công bởi mầm bệnh, và do đó chitinase được xem là vũ khí quan trọng của thực vật trong phòng chống bệnh [58].

Chitinase thực vật có độ dài trung bình trong khoảng 178 – 479 amino axit, với KLPT trung bình 30 – 50 kDa. Vùng xúc tác đặc trưng trong chitinase là vùng glycosyl hydrolase. Glycosyl hydrolase là một nhóm enzyme thủy phân liên kết glycoside giữa hai hoặc nhiều carbohydrate hoặc giữa carbohydrate và một nửa không

carbohydrate. Trên cơ sở tương đồng trình tự, gần 85 họ glycosyl hydrolase khác nhau đã được đề xuất. Dựa trên đặc điểm của vùng xúc tác, chitinase được nhóm thành hai họ sau: họ glycosyl hydrolase 18 (GH18) và họ glycosyl hydrolase 19 (GH19). Chitinase (bao gồm cả chitodextrinase phân hủy chitooligosaccharide, nhưng không phân cắt chitin) thuộc GH18 bao gồm các thành viên chitinase thực vật loại III và V. Họ GH19 chỉ bao gồm các chitinase của các thành viên loại I, II và IV. Vùng xúc tác của chitinase bao gồm khoảng 220 đến 230 gốc axit amin. Sự khác biệt giữa chitinase loại I và II nằm ở sự hiện diện (loại I) hoặc vắng mặt (loại II) của vùng liên kết chitin (CBD) tại vùng đầu cuối N. Vùng CBD bao gồm một vùng giàu cysteine, được bảo tồn cao với khoảng 40 gốc axit amin. Chitinase loại V, lần đầu tiên được phân lập từ thuốc lá, cũng tương tự như exochitinase của vi khuẩn và chitinase loại III. Ngoài ra, chitinase loại V có phần mở rộng đầu C để nhắm mục tiêu không bào và chứa hai CBD. Chitinase loại III và loại V thể hiện một hoạt động lysozymal bổ sung. Chitinase loại VI tương tự như chitinase củ cải đường và sở hữu 1/2 CBD. Cho đến nay, nhiều loại chitinase đang được phát hiện và phân tích [59].

Khi các phân tử chitin hoặc OC từ thành tế bào nấm giải phóng (do chitinase thực vật xúc tác thủy phân tế bào nấm); hoặc khi xử lý phun chitin hay OC lên cây trồng thì tế bào cây trồng nhận diện như bị mầm bệnh tấn công. Sau đó tiếp nhận và dẫn truyền tín hiệu gây đáp ứng kích hoạt hệ miễn dịch tự nhiên hoặc sinh tổng hợp PR-protein để loại trừ mầm bệnh, trong đó gia tăng hoạt tính chitinase được xem là dấu hiệu (marker) của phản ứng miễn dịch phòng vệ [58].

1.5. Đậu nành và bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum truncatum*

1.5.1. Cây đậu nành

Đậu nành (*Glycine max*), một trong những loại cây trồng có giá trị kinh tế cao và là cây lương thực quan trọng cung cấp protein và dầu thực vật trên thế giới [60]. Cây thuộc họ đậu (Fabacea), bộ Fabales, có nguồn gốc từ Đông Bắc Á (Trung Quốc) được biết đến từ 5.000 năm nay, cây có thời gian sinh trưởng, phát triển cho đến thu hoạch trong khoảng 3 – 4 tháng [61].

Đậu nành có giá trị dinh dưỡng cao được các nhà khoa học xếp vào một trong những cây trồng thuộc dạng “thực phẩm chức năng” và đóng vai trò thiết yếu để nâng cao tiêu chuẩn thực phẩm cho con người ở những nước đang phát triển trong tình trạng thiếu hụt protein [62]. Lượng dầu từ đậu nành đứng ở vị trí thứ nhất trong tổng số dầu thực vật được tiêu thụ trên thế giới. Hạt đậu nành có thành phần dinh dưỡng cao, với lượng protein trung bình từ 38 – 40%, lipit 18 – 20%, giàu muối khoáng.

Protein của đậu nành có phẩm chất tốt nhất trong số các protein của thực vật, cao hơn cả ở cá, thịt và cao gấp hai lần hàm lượng protein có trong các loại đậu đỗ khác. Hàm lượng dầu béo cao hơn các loại đậu đỗ khác nên được coi là cây cung cấp dầu thực vật đáng kể. Lipit của đậu nành chứa một tỷ lệ cao các axit béo không bão hòa có hệ số đồng hoá cao, mùi vị thơm ngon; dùng dầu đậu nành thay mỡ động vật có thể tránh được xơ vữa động mạch. Trong hạt đậu nành còn có nhiều loại vitamin, đặc biệt là hàm lượng của các vitamin B1 và B2, ngoài ra còn có các loại vitamin PP, A, E, K, D, C,.. và các loại muối khoáng khác.

Trong 3 nguồn thực phẩm cho con người và gia súc, đậu nành là nguồn đạm thực vật rẻ tiền và quan trọng nhất, cho đến hiện nay đậu nành được trồng ở 80 quốc gia khắp các châu lục. Năm 2010, diện tích đậu nành của thế giới ước đạt 102,3 triệu ha, sản lượng 261,5 triệu tấn, năng suất ước đạt 25,5 tạ/ha. Quốc gia có diện tích trồng đậu nành lớn nhất là Mỹ (31,1 triệu ha, năng suất 29,2 tạ/ha). Châu Á chiếm vị trí thứ 2 về diện tích với 19,7 triệu ha, năng suất ước đạt 14,1 tạ/ha; trong đó Trung Quốc có 8,5 triệu ha, năng suất 17,7 tạ/ha; Ấn Độ 9,2 triệu ha, năng suất 10,6 tạ/ha [61, 63].

Đậu nành là một cây công nghiệp và thực phẩm quan trọng trong cơ cấu cây trồng nông nghiệp ở Việt Nam. Mặc dù vậy, diện tích canh tác cây đậu nành vẫn chưa cao tại nước ta, điều này có thể đến từ nhiều nguyên nhân nhưng một trong số những trở ngại lớn nhất vẫn là người nông dân chưa được trang bị về kỹ thuật canh tác và quản lý sâu, bệnh hại. Theo quy hoạch của Nhà nước, vùng sản xuất đậu nành sẽ tập trung chủ yếu ở Tây Nguyên, Đông Nam bộ và Đồng bằng sông Cửu Long. Như vậy để có thể thực hiện những chỉ tiêu của Nhà nước đề ra, trong giai đoạn tới cần tập trung nghiên cứu xác định tiến bộ kỹ thuật, giống thích hợp cho các vùng trọng điểm nói trên; xác định những yếu tố gây hạn chế năng suất đậu nành; và xây dựng quy trình kỹ thuật phù hợp từng vùng để tăng tính hiệu quả trong sản xuất. Hiện nay, đậu nành đang được khuyến khích phát triển trong cơ cấu 2 lúa – 1 màu.

Tại Việt Nam, đậu nành có thị trường tiêu thụ rộng, tuy có tiềm năng diện tích và điều kiện trồng được 3 vụ/năm, nhưng diện tích sản xuất có chiều hướng thu hẹp trong các năm gần đây. Diện tích trồng đậu nành cả nước trong năm 2015 khoảng 100,8 nghìn ha, sản lượng ước đạt 148,4 nghìn tấn, năng suất đạt ~1,47 tấn/ha (**Niên giám Thống kê, 2016**). Nguyên nhân chủ yếu do đậu nành của Việt Nam có năng suất thấp, hiệu quả kinh tế chưa cao, chưa cạnh tranh được với các loại cây trồng khác và so với cây đậu nành trên thế giới.

Một trong những trở ngại lớn trong canh tác đậu nành là loại cây trồng này rất dễ bị tấn công bởi các mầm bệnh do vi sinh vật. Trong số đó, bệnh thán thư do nấm

Colletotrichum truncatum gây ra là một trong những bệnh rất phổ biến và gây thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất (giảm 30 – 70%) của cây đậu nành [62].

Ngoài ra ở nước ta, tồn tại 5 nguyên nhân làm hạn chế hiệu quả sản xuất và khó khăn khi mở rộng diện tích đậu nành. Thứ nhất, nông dân vẫn coi đậu nành là cây trồng phụ, ít quan tâm đầu tư thâm canh như các cây trồng khác, khả năng cạnh tranh về hiệu quả sản xuất chưa cao; thứ 2, thời tiết khó khăn gây ra nhiều rủi ro cho canh tác đậu nành như thời tiết cực đoan, hạn, úng, gió bão gây trở ngại khi gieo hạt, ảnh hưởng quá trình sinh trưởng và phát triển; thứ 3, sâu bệnh đặc biệt là các loại sâu như sâu khoang, sâu cuốn lá, sâu đục quả, giòi đục thân, bọ xít, các loại bệnh hại do nấm mà đặc biệt là bệnh thán thư do *Colletotrichum* sp. thường xuyên xuất hiện trên các diện tích canh tác đậu nành gây thiệt hại nặng nề; thứ 4, nông dân thiếu nguồn giống tốt, giống cung ứng cho nông dân thường xuyên có tỷ lệ nảy mầm thấp; và thứ 5 là giá bán chưa hợp lý. Trong tất cả các nguyên nhân kể trên, hiện nay trên tất cả các diện tích trồng đậu nành của Việt Nam, bệnh thán thư đang là đối tượng gây thiệt hại nghiêm trọng nhất. Trong các bộ phận của cây chứa nhiều chất dinh dưỡng đặc biệt là chất đạm nên đậu nành là đối tượng hấp dẫn của nhiều loại sâu bệnh hại. Điều kiện nhiệt đới nóng ẩm làm cho vòng đời của sâu bệnh tương đối ngắn, mức độ phá hoại rất nghiêm trọng nếu không bố trí cây trồng và thời vụ hợp lý [61].

1.5.2. Nấm *Colletotrichum truncatum* gây bệnh thán thư trên đậu nành

Nấm *Colletotrichum* xuất hiện và gây bệnh trên tất cả các giai đoạn sinh trưởng, phát triển của cây đậu nành như giai đoạn nảy mầm, cây con, các bộ phận lá, quả và vỏ. Loài *Colletotrichum truncatum* (*C. truncatum*) có thể lan truyền qua hạt giống nhiễm bệnh sau đó phát triển ở vỏ quả. Nhiều thí nghiệm đều chứng tỏ nấm *C. truncatum* gây bệnh thán thư có khả năng lây từ cây mẹ sang cây con. Theo [Nagaraj và cộng sự](#) (2014), nấm *C. truncatum* gây bệnh thán thư và gây hại ở tất cả các giai đoạn của cây trồng, gây thối hạt, chết rạp cây con khi mới nảy mầm. Trên lá mầm bị nhiễm bệnh thường có vết lõm xuống, vết bệnh màu tối, lan dần trên trụ lá mầm hoặc hướng xuống dưới rễ. Hạt bị khô quắt, ban đầu bị mốc sau chuyển màu nâu, có các vùng xám nhỏ bất thường với các đốm màu đen. Các giai đoạn tiếp theo và cuối giai đoạn sinh sản của cây, các mô tế bào bệnh bị bao phủ bởi các đĩa cảnh màu đen, bào tử mọc ra các lông gai nhỏ màu đen có thể quan sát bằng mắt thường. Cây bị nhiễm bệnh ở giai đoạn sớm thường không đậu quả, nếu đậu quả thì hạt không phát triển hoặc phát triển với số lượng ít. Lá khi bị nhiễm bệnh thường có triệu chứng thối gân lá, lá xoắn và loét cuống, các vết bệnh xuất hiện ở lá non, cây bệnh lùn hơn cây khỏe và hóa già sớm hơn vì ảnh hưởng kết hợp với các tổn thương trên thân và cuống. Đĩa

cành của nấm có thể mọc đơn lẻ hoặc mọc tập trung thành đám dạng hình bán cầu hoặc nón cụt, các lông gai trên đĩa cành có màu nâu hoặc nâu đen thường thon và dài, mọc nhô lên trên đám bào tử phân sinh. Bào tử phân sinh không màu, đơn bào, có dạng ô van, thon dài, nhọn và uốn cong, trong suốt, có kích thước khoảng $17-31 \times 3-4 \mu\text{m}$. Lông cứng trên đĩa cành có kích thước khoảng $60-300 \times 3-8 \mu\text{m}$ đan xen dày đặc, màu đen và có dạng hình lá lúa. Bào tử lan truyền qua gió, mưa, nước tưới, xâm nhập trực tiếp vào cây hoặc thông qua các vết thương cơ giới. Bào tử nảy mầm và hình thành giác bám trong ~6 giờ. Chu kỳ phát triển của nấm cần 60 – 65 giờ để biểu hiện triệu chứng và biểu hiện nhiễm chậm phát [64].

Một số kết quả nghiên cứu *in vitro* tại Ấn Độ cho thấy nhiệt độ tối thích cho bào tử nảy mầm và kéo dài ống mầm là 20°C , nhiễm trên vỏ đậu là 25°C . Thời gian chiếu sáng tối thích cho nảy mầm là 3 giờ sáng và 9 giờ tối, nhiễm bệnh cho vỏ hạt là 12 giờ sáng và 12 giờ tối, sự nhiễm và phát triển bào tử ở hạt đậu nành đòi hỏi thời gian chiếu sáng dài hơn và ẩm độ đạt 100%. Khi phân lập và nuôi cấy nấm *C. truncatum* với các giống khác nhau thì khả năng gây bệnh khác nhau. Nấm *C. truncatum* có phạm vi ký chủ rộng trên nhiều loại cây trồng trong đó có đậu nành.

Bệnh thán thư trên cây đậu nành chủ yếu do loài nấm *C. truncatum* và nấm *C. gloeosporioides*, bệnh thường lan rộng ở các vùng trồng chuyên canh đậu nành và gây tổn thất lớn, nhất là các vùng trồng có nền nhiệt ẩm và độ ẩm cao. Tại Alabama năng suất đậu nành giảm 19,4% trên 3 vụ so với các vùng trồng đã dùng thuốc trừ nấm. Tại Nigeria năm 1975, nấm *Colletotrichum* xuất hiện và làm giảm 30% năng suất đậu nành. Kết quả điều tra ở hai bang của Brazil cho thấy nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư đã xuất hiện trên 57% diện tích trồng đậu nành [64]. Ở Việt Nam, theo nghiên cứu điều tra thành phần nấm hại đậu nành trên đồng ruộng vùng Hà Nội trong vụ đông 2010 - 2012 gồm có 9 loài nấm thuộc 7 họ trong 5 bộ, xuất hiện với mức độ khác nhau và gây hại từ lúc đậu nành nảy mầm đến khi thu hoạch. Trong đó bệnh thán thư do nấm *C. truncatum* và bệnh đốm lá do nấm *Alternaria alternate* có mức độ phổ biến nhất. Tỷ lệ bệnh thán thư cao nhất lên tới 19,87% [61].

Bệnh thán thư chủ yếu do nấm *C. truncatum* tồn tại trên hạt giống và truyền sang cây con, khả năng xuất hiện của chúng ngoài đồng ruộng còn phụ thuộc vào điều kiện môi trường. Theo Kumar và cộng sự (2000), khi nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến sự phát triển của bệnh thán thư ở đậu nành trên đồng ruộng ở Ấn Độ cho thấy triệu chứng xuất hiện nhiều nhất ở tuần thứ 2 và thứ 3 của tháng 9 và tuần đầu tiên vào tháng 10. Trong giai đoạn này, nhiệt độ trung bình, ẩm độ và lượng mưa tương ứng $28,4^{\circ}\text{C}$, 76% và 92,5 mm. Bệnh xuất hiện ít trong điều kiện nhiệt độ

cao, ẩm độ và lượng mưa tương đối thấp. Tỷ lệ nhiễm nấm *C. truncatum* cao khi mật độ trồng dày. Tại Ấn Độ, triệu chứng lá nhiễm bệnh trên đậu nành trồng sớm xuất hiện nhiều hơn so với trồng muộn. Hạt giống thu hoạch từ đậu nành trồng sớm có sức nảy mầm thấp và tỷ lệ cây nhiễm bệnh cao. Việc xuất hiện cỏ dại không ảnh hưởng hay làm tăng tỷ lệ nhiễm bệnh. Ngoài ra, bệnh còn phụ thuộc vào thời gian gieo trồng và khoảng cách luống. Trong điều kiện nhà kính, bón canxi cho đất làm giảm sự phát triển của bệnh trên hạt. Qua nhiều tài liệu khoa học công bố cho thấy các yếu tố thời vụ, khí hậu, phân bón đều có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của bệnh, nhưng nguyên nhân chủ yếu vẫn là nguồn nấm bệnh tồn tại trên hạt giống [3].

Cho đến nay, biện pháp kiểm soát bệnh thán thư trên cây đậu nành chủ yếu sử dụng các sản phẩm thuốc diệt nấm hóa học truyền thống như: carbendazim, mancozeb, copper oxychloride, tebuconazole, bencomyl,.. có nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe con người và sinh thái [63, 65]. Do vậy, nhiều công trình nghiên cứu đã và đang thực hiện theo hướng: cải tạo giống, phương pháp canh tác, và tạo chế phẩm kiểm soát bệnh thán thư an toàn, hiệu quả. Nghiên cứu và khai thác sử dụng các hoạt chất tự nhiên và các dẫn xuất của chúng đang được quan tâm lớn và bước đầu ghi nhận được kết quả theo kỳ vọng.

1.6. Tình hình nghiên cứu ngoài nước

Hoạt tính sinh học của chitosan (CTS) phụ thuộc chủ yếu vào khối lượng phân tử (KLPT) và độ deacetyl (ĐĐA%) của chúng. Thông thường CTS nguyên liệu có KLPT cao, độ kết tinh cao và nhiều liên kết hydro chằng chéo trong chuỗi phân tử làm cho CTS khó tan, độ nhớt cao nên hạn chế khả năng ứng dụng.

Nhiều phương pháp cắt mạch điều chỉnh giảm KLPT của CTS đã được áp dụng như hóa học, sinh học và vật lý. Trong đó, sử dụng phương pháp vật lý là dùng bức xạ tia gamma Co^{60} hay bức xạ dòng điện tử gia tốc (EB) để cắt mạch CTS đã được đánh giá là hiệu quả cao do tính thân thiện môi trường, dễ dàng điều chỉnh KLPT của sản phẩm theo mong muốn, sản phẩm tinh sạch và khả năng chế tạo quy mô lớn. Kết quả nghiên cứu của [Hien và cộng sự](#) (2012) cho thấy rằng KLPT của CTS ban đầu ~100 kDa đã giảm xuống nhỏ hơn 10 kDa khi xử lý chiếu xạ dung dịch 5% CTS trong axit lactic loãng có bổ sung ~1% H_2O_2 chỉ với liều xạ ~4 kGy [26]. Nhóm tác giả [Zou và cộng sự](#) (2015) đã điều chỉnh ĐĐA% của CTS thành công bằng phương pháp acetyl hóa CTS bởi anhydric acetic. Sản phẩm CTS acetyl hóa có khả năng hòa tan trong nước nên được quan tâm nghiên cứu ứng dụng [66].

Hoạt chất CTS với KLPT thấp (< 100 kDa) đã được nghiên cứu ứng dụng

trong lĩnh vực sinh y, mỹ phẩm và chăn nuôi, nuôi trồng thủy sản,.. do CTS có hoạt tính chống oxi hóa và kích thích miễn dịch. Nhóm tác giả [Nghiep và cộng sự](#) (2012) đã nghiên cứu khá toàn diện về khả năng chống oxi hóa, bắt gốc tự do của oligochitosan (OC) có KLPT ~3 kDa trên tế bào động vật và tế bào người. Kết quả nhận được cho thấy OC có hoạt tính trung hòa hiệu quả các chất oxi hóa giúp cân bằng ổn định nội môi của tế bào, và OC bảo vệ sự tổn thương DNA giúp tế bào chống lại các yếu tố tác động có hại [67]. Hiệu quả tăng cường khả năng miễn dịch của OC đối với động vật cũng đã được [Luo và cộng sự](#) (2009) minh chứng. Kết quả nghiên cứu cho thấy khi cho cá hồi ăn thức ăn có bổ sung 0,4% OC đã làm tăng cường hệ miễn dịch và tăng khả năng sống sót sau khi cho cá lây nhiễm với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* [68]. Ngoài ra, hiệu ứng kháng khuẩn [69], kháng nấm [70], kháng vi rút [71], kháng tuyến trùng [72] và hiệu ứng tăng cường khả năng cố định đạm trên cây họ đậu [73] của CTS và OC đã được chứng minh.

Hiệu ứng kích thích tăng trưởng và kích kháng bệnh của CTS và OC đối với cây trồng cũng đã được nhiều tác giả công bố. Theo [Dzung và cộng sự](#) (2011) xử lý phun qua lá dung dịch OC (KLPT ~2 kDa) với nồng độ 60 ppm đã làm gia tăng đáng kể các chỉ tiêu tăng trưởng và gia tăng độ chịu hạn cho cây cà phê [74]. [El-Sawy và cộng sự](#) (2010) công bố rằng xử lý phun qua lá cây đậu tằm (*Faba bean*) dung dịch OC (cắt mạch bằng bức xạ) nồng độ 100 ppm đã làm tăng khả năng sinh trưởng và năng suất thu hoạch [75]. [Luan và cộng sự](#) (2005) đã nghiên cứu hiệu ứng kích thích tăng trưởng và tăng sinh phytoalexin của mô hoa cúc, mô cây nho và mô hoa tulip của OC chế tạo bằng phương pháp cắt mạch bức xạ gamma Co⁶⁰. Kết quả cho thấy bổ sung CTS KLPT thấp hoặc OC vào môi trường nuôi cấy mô đã kích thích gia tăng các chỉ số sinh trưởng và kích tạo PR-protein (protein do cây tạo ra khi cây tiếp xúc với mầm bệnh – giống kháng thể) kháng bệnh của mô thực vật [76].

Gần đây hơn, [Zou và cộng sự](#) (2015) công bố kết quả tăng khả năng chịu mặn của cây lúa mì khi được xử lý OC, do OC kích thích sinh trưởng và kích thích hệ thống enzyme chống oxi hóa của tế bào [66]. [Muley và cộng sự](#) (2019) đã nghiên cứu hiệu quả xử lý phun dung dịch CTS KLPT thấp và OC được chế tạo bằng phương pháp cắt mạch bằng bức xạ tia gamma Co⁶⁰ trên cây khoai tây [77]. Khi phun qua lá dung dịch CTS cắt mạch với nồng độ 50 – 75 ppm lên cây khoai tây (*Solanum tuberosum* L.) ba lần vào thời điểm 20, 30, và 40 ngày sau ra cây, kết quả cho thấy sản phẩm CTS cắt mạch bức xạ có hiệu ứng kích thích sinh trưởng, tăng khả năng chống chịu tác động môi trường, tăng các chỉ số tăng trưởng và đặc biệt gia tăng biểu hiện các enzyme chống oxi hóa và enzyme đáp ứng phản vệ như CAT, POD, SOD, chitosanase và chitinase. Hơn nữa, trong công trình này cũng ghi nhận mức độ cải

thiện các thông số đã kể trên của OC là tốt hơn so với CTS [77]. Hiệu ứng kích kháng bệnh đạo ôn cháy lá do nấm *Pyricularia grisea* của CTS và OC đối với cây lúa đã được thực hiện và công bố [78]. Kết quả ghi nhận được cho thấy, OC thể hiện hoạt tính kích kháng bệnh tốt hơn so với CTS dựa trên hàm lượng PR-protein tạo ra sau khi xử lý hạt lúa với CTS hoặc OC rồi cho nhiễm bệnh. Theo báo cáo tổng hợp của Yin và cộng sự (2010) về hiệu ứng kích kháng bệnh của OC đối với cây trồng cho thấy, OC thể hiện hiệu ứng kích kháng bệnh cho hơn 30 loại bệnh do vi sinh vật gây ra trên 24 loại cây trồng, và nhóm tác giả cũng khẳng định rằng OC là một loại vắc xin thực vật [33].

Đối với cây đậu nành (*Glycine max*), một trong những loại cây trồng có giá trị kinh tế cao và là cây lương thực quan trọng nhưng cây đậu nành rất dễ bị tấn công bởi các mầm bệnh do vi sinh vật. Trong số đó, bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum truncatum* gây ra là một trong những bệnh rất phổ biến và gây thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất (giảm 30 – 70%) đậu nành [62]. Mặc dù vậy cho đến nay, chưa có công trình nghiên cứu nào về hiệu ứng kích kháng bệnh thán thư của OC trên cây đậu nành được công bố. Tuy nhiên theo kết quả nghiên cứu của Prapagdee và cộng sự (2007) cho thấy khi phun qua lá dung dịch CTS (loại có KLPT 200 kDa, ĐĐA 85%) đã giảm tỷ lệ bệnh chết nhanh (do nấm *Fusarium solani* gây ra) trên cây đậu nành [79]. Hơn nữa, Hirano và cộng sự (2001) cũng đã công bố kết quả xử lý hạt đậu nành với oligochitin hay oligochitosan đã làm gia tăng đáng kể hàm lượng chitinase, một loại PR-protein do cây sinh ra để chống mầm bệnh do vi sinh vật [80].

Theo một số kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy rằng CTS hoặc OC ở dạng phức chelate với ion kim loại như Cu^{2+} , Zn^{2+} đã thể hiện một số hiệu ứng sinh học mạnh hơn so với dạng không chelate. Điển hình như hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của phức CTS- Zn^{2+} cao hơn 2 – 8 lần so với CTS (788 kDa) và 4 – 16 lần so với Zn^{2+} (muối kẽm sulphat), nguyên do được giải thích là mật độ điện tích dương cao làm gia tăng khả năng tương tác của phức CTS- Zn^{2+} với tế bào vi sinh vật [36].

Kẽm là một nguyên tố vi lượng có vai trò rất quan trọng cho sức khỏe của con người, động vật, và thực vật do chúng là thành phần coenzyme của nhiều enzyme quan trọng của tế bào động thực vật [36, 43]. Kẽm có vai trò quan trọng trong hệ thống miễn dịch và có khả năng kháng khuẩn.

Năm 2006, nhóm tác giả Aziz và cộng sự (2006) đã công bố kết quả nghiên cứu hiệu ứng kích kháng bệnh thối xám (do nấm *Botrytis cinerea*) và bệnh sương mai (do nấm *Plasmopara viticola*) của phức chelate CTS- Cu^{2+} và của OC- Cu^{2+} trên cây nho [56]. Kết quả cho thấy hiệu ứng kích kháng bệnh của phức OC- Cu^{2+} tốt hơn so

với phức CTS-Cu²⁺ thông qua sự tăng hàm lượng phytoalexin, hàm lượng PR-protein và mức độ giảm tỷ lệ bệnh. Nhóm tác giả Ibrahim và cộng sự (2015) đã minh chứng hiệu ứng kích thích tăng trưởng của phức CTS-Zn²⁺ trên cây đậu ve (*Phaseolus vulgaris*) [81]. Kết quả nhận được cho thấy, phun dung dịch phức CTS-Zn²⁺ qua lá đã làm tăng cường sinh trưởng, tăng hiệu quả hấp thu dưỡng chất, tăng năng suất cây đậu từ 25 – 33%, và giảm ảnh hưởng bất lợi do nhiệt độ môi trường. Nhóm tác giả đã giải thích hiệu ứng kích thích tăng trưởng là do cây đậu được bổ sung nguyên tố vi lượng Zn²⁺ thường bị thiếu hụt trong đất; và do vai trò của kẽm, CTS làm gia tăng khả năng hấp thu dưỡng chất, tăng cường sự phân chia tế bào và tăng hàm lượng chlorophyll trong lá. Mặc dù vậy, cho đến nay chưa có công trình nghiên cứu tổng thể nào về hiệu quả phòng trừ bệnh thông qua hiệu ứng kích kháng bệnh của phức OC-Zn²⁺ trên cây trồng.

1.7. Tình hình nghiên cứu trong nước

Hiệu ứng phòng trừ bệnh và kích thích tăng trưởng của CTS và OC trên cây trồng cũng đã được thực hiện nghiên cứu tại nhiều cơ sở nghiên cứu khoa học trong nước. Nhóm nghiên cứu Dũng và cộng sự, Đại học Tây nguyên đã công bố kết quả hiệu ứng kích thích tăng trưởng và gia tăng khả năng chống chịu hạn trên cây cà phê của OC [74]. Nhóm tác giả Luân và cộng sự (2005), Trung tâm Hạt nhân – TP. HCM cũng đã minh chứng hiệu ứng kích thích tăng trưởng mô thực vật của OC [76]. Hiền và cộng sự, Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ – TP. HCM đã nghiên cứu hiệu ứng kích kháng bệnh và tăng trưởng của OC trên cây lúa và cây mía [82], và nhóm tác giả này cũng đồng thời nghiên cứu sơ bộ hiệu ứng kích thích tăng trưởng và chống bệnh của hỗn hợp CTS cắt mạch bức xạ với ion Zn²⁺. Kết quả nhận được cho thấy, khi phun qua lá dung dịch 40 ppm chitosan – 40 ppm Zn²⁺ ba lần ở giai đoạn mía non, năng suất mía tăng ~12% và tỷ lệ bệnh lá giảm ~36%, tỷ lệ bệnh thân mía giảm ~66% so với đối chứng [83].

Gần đây hơn, hiệu ứng kích kháng bệnh thán thư của chế phẩm OC/nanosilica trên cây ớt đã được nghiên cứu bởi Hiệt và cộng sự (2015), Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao – TP. HCM [84]. Năm 2017, vật liệu lai giữa OC và nanosilica (OCS/nSiO₂) cũng được các nhóm tác giả Dũng và cộng sự (2017) [32]; Thủy và cộng sự (2017) [85] nghiên cứu hiệu ứng kích thích tăng trưởng và kích kháng bệnh thán thư trên cây ớt. Kết quả cho thấy OCS/nSiO₂ (50 mg/l – 50 mg/l) có hiệu ứng tăng sinh khối khô, sinh khối tươi, chiều cao cây và hàm lượng chlorophyll *a* và *b*. Bên cạnh đó tỷ lệ bệnh thán thư trên cây ớt không xuất hiện khi tiến hành gây nhiễm nấm *Colletotrichum* sp., trong khi đó ở lô đối chứng tỷ lệ bệnh

là 100%. Hiệu ứng kháng nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên cây xoài của CTS (KLPT ~350 kDa) cũng được nhóm nghiên cứu [Duy và cộng sự](#) (2014) thực hiện và công bố. Kết quả cho thấy CTS có hiệu ứng ức chế trực tiếp nấm *C. gloeosporioides* trong điều kiện *in vitro* và giảm mức độ bệnh thán thư trên quả xoài Hòa Lộc [86]. Gần đây hơn, [Tuấn và cộng sự](#) (2019), Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, đã công bố kết quả nghiên cứu hiệu ứng kích kháng bệnh thối nâu trên cây thanh long của phức OC-nanosilica vỏ trấu [87]. Kết quả thu được cho thấy tiềm năng ứng dụng chế phẩm phức làm chất bảo vệ cây thanh long và cây trồng khác.

Nhìn chung, theo các kết quả nghiên cứu ghi nhận được cho thấy CTS hoặc OC có hiệu ứng kích thích tăng trưởng, giảm tỷ lệ bệnh và tăng năng suất trên các cây trồng khác nhau. Mặc dù vậy cho đến nay, hiệu ứng phòng trừ bệnh thán thư trên cây đậu nành của phức OC-Zn²⁺ vẫn chưa được đơn vị nghiên cứu nào trong nước công bố. Vì vậy đề tài nghiên cứu về hiệu quả phòng trừ bệnh thông qua hiệu ứng kích kháng bệnh của chế phẩm OC-Zn²⁺ trên cây đậu nành cần được xây dựng và thực hiện nhằm chế tạo chế phẩm có nguồn gốc sinh học an toàn (phức OC-Zn²⁺) ứng dụng làm chất phòng trừ bệnh cho cây đậu nành và tiềm năng mở rộng cho các đối tượng cây trồng khác, góp phần phát triển sản xuất nông phẩm an toàn bền vững.

Theo thông tin kết quả thu thập từ các nguồn tài liệu đã đề cập ở trên cho thấy, hoạt tính sinh học của CTS phụ thuộc chủ yếu vào KLPT. Hiệu quả phòng trừ bệnh và kích thích tăng trưởng của CTS, OC, và phức của chúng với Zn²⁺ đã được minh chứng trên nhiều loại cây trồng. Tuy nhiên, đối với hiệu ứng kích kháng bệnh thán thư trên đậu nành của phức OC-Zn²⁺ thì chưa được nghiên cứu. Vì vậy, trong phạm vi đề tài luận án này, chúng tôi thực hiện một số nội dung nghiên cứu mới như sau:

Xác lập điều kiện thích hợp để chế tạo OC và phức OC-Zn²⁺ có đặc trưng tính chất ổn định và hoạt tính sinh học hiệu quả theo định hướng triển khai sản xuất và ứng dụng quy mô lớn.

Khảo sát ảnh hưởng khối lượng phân tử (2000 – 8000 Da) của OC và tỷ lệ phần mol (–NH₂/Zn²⁺) đến hiệu quả phòng trừ bệnh thán thư của phức OC-Zn²⁺.

Lựa chọn nồng độ thích hợp của phức OC-Zn²⁺ phòng trừ bệnh thán thư hiệu quả trên cây đậu nành.

Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh và tác động sinh trưởng phát triển của phức OC-Zn²⁺ đối với cây đậu nành trên ruộng thí nghiệm.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ THIẾT BỊ

2.1.1. Nguyên vật liệu và hóa chất

- Chitosan nguồn gốc từ chitin vỏ tôm, dạng vảy, khối lượng phân tử ~171 kDa, là sản phẩm của Doanh nghiệp Tư Nhân Phan Bùi, TP. Vũng Tàu.
- Hạt giống đậu nành: HL 07-15, nguồn gốc từ tổ hợp lai HL 203 × HL 92, có thời gian sinh trưởng 78 – 85 ngày; được Bộ Nông nghiệp và PTNT công nhận sản xuất thử cho vùng Đông Nam Bộ, Tây Nguyên và Đồng bằng sông Cửu Long theo Quyết định số 333/QĐ-TT-CNN ngày 05/08/2013. Hạt giống được Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Nông nghiệp Hưng Lộc, Đồng Nai cung cấp.
- Chủng nấm gây bệnh thán thư *Colletotrichum truncatum*: Được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao (AHRD), Củ Chi, TP. HCM. Chủng nấm được phân lập từ cây đậu nành nhiễm bệnh thán thư, định danh theo hình thái và nhân nuôi, lưu giữ giống tại Phòng Nghiên cứu bệnh học Cây trồng và Vật nuôi, Trung tâm AHRD.
- Môi trường nuôi cấy nấm: Potato Dextrose Agar (PDA), Hãng Himedia, Ấn Độ.
- Muối kẽm nitrate: $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, tinh khiết >99%, Trung Quốc; Hydrogen peroxide: H_2O_2 , nồng độ 30%, khối lượng riêng 1,11 g/ml, Merck, Đức; Axít lactic: $C_3H_6O_3$, nồng độ 88%, Trung Quốc.
- N-acetyl-D-glucosamine (GluNAc): $C_8H_{15}O_6$, 221,21 g/mol, tinh khiết >99%, Sigma-Aldrich; 3,5 dinitrosalicylic axít (DNS): $C_7H_4N_2O_7$, 228,12 g/mol, tinh khiết >98%, Merck, Đức.
- Bộ chất chuẩn pullulan (khối lượng phân tử Mw 780 – 380.000 Da): Sigma, Mỹ.
- Deuterate oxide (D_2O) và deuterated acetic axít (CD_3COOD): tinh khiết phân tích, Cambridge Isotope Laboratories, Anh; Potassium bromide: KBr, tinh khiết >99,8%, Merck, Đức; Acetol: C_3H_6O , tinh khiết phân tích, Trung Quốc; Ethanol absolute: C_2H_5OH 99,5°, CEMACO, Việt Nam.
- Các hóa chất khác để pha đệm và thuốc thử: NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , muối Rochell, $NaHSO_3$, phenol, NaOH, HCl, NH_3 , NaCl,.. dạng tinh khiết phân tích, sản phẩm của Trung Quốc.
- Nước tinh khiết gồm: nước cất 01 lần dùng tạo mẫu chế phẩm và nước siêu tinh khiết (Merck, Đức) dùng pha đệm, dung môi và tạo thuốc thử.

2.1.2. Thiết bị và dụng cụ

- Máy chiếu xạ tia gamma công nghiệp, nguồn bức xạ đồng vị Co^{60} , SVST Co-60/B, Hungary, suất liều $\sim 1,1$ kGy/giờ, tại Trung tâm VINAGAMMA, TP. HCM.
- Máy quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier, FTIR 8400s, Shimadzu, Nhật; Máy quang phổ UV-Vis, Jasco V630, Nhật, tại Trung tâm VINAGAMMA, TP. HCM.
- Máy sắc ký gel thẩm qua (GPC): HPLC, LC-20AB Shimadzu, Nhật, sử dụng detector RID - 10A và cột Ultrahydrogel 250 của hãng Waters, Mỹ, tại Trung tâm VINAGAMMA, TP. HCM.
- Máy nghiền bi Fritsch, Đức; Tủ sấy quạt gió, DNF 410, Yamato, Nhật; Máy khuấy từ gia nhiệt: AGIMATIC-ED, Tây Ban Nha; Máy khuấy cánh inox IKA-RW20, Malaysia, tại Trung tâm VINAGAMMA, TP. HCM.
- Bể lắc ổn nhiệt: CERTOMAT-WR, Đức; Nồi hấp tiệt trùng: Yamato, SM200, Nhật; Tủ ấm nuôi ủ vi sinh vật: Incubator, Memmert, Đức; Tủ cấy vi sinh: LABCONCO, Mỹ, tại Trung tâm VINAGAMMA, TP. HCM.
- Máy siêu ly tâm (max 50.000 rpm): Ultra 5.0, hãng HANIL, Hàn Quốc, tại Trung tâm VINAGAMMA, TP. HCM.
- Máy đo pH cầm tay: Seven2Go pH S8-Std-Kit, METTLER TOLEDO, Trung Quốc, tại Trung tâm VINAGAMMA, TP. HCM.
- Máy đo phổ phát xạ nguyên tử cảm ứng plasma (ICP-AES), PerkinElmer, Optima 5300DV, Mỹ, tại Trung tâm Phân tích Thí nghiệm, Q. 3, TP. HCM.
- Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton ($^1\text{H-NMR}$): Bruker AVANCE III 500 spectrometer, Bruker BioSpin AG, Thái Lan, tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, TP. HCM.
- Máy đo tán sắc năng lượng tia X (EDX): JEOL 6610 LA, Nhật gắn cùng thiết bị FE-SEM, S-4800, Hitachi, Nhật, tại Trung tâm Nghiên cứu Triển khai – Khu Công nghệ cao, TP. HCM.
- Máy đo nhiễu xạ tia X (XRD): Siemens D5000, Đức, tại Trung tâm Phân tích Hóa lý, Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, TP. HCM.
- Một số trang thiết bị cần thiết khác dùng cho thí nghiệm như: thiết bị dụng cụ thủy tinh, bộ chày cối sứ, chày cối mã não, chậu nhựa trồng cây, nhà kính và hệ thống tưới nhỏ giọt, buồng đếm hồng cầu Neubauer haemocytometer,.. tại Phòng thí nghiệm Trung tâm VINAGAMMA và Trung tâm AHRD, TP. HCM.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Chế tạo oligochitosan, phức oligochitosan-Zn²⁺ và xác định các đặc trưng

a) Chế tạo chitosan khối lượng phân tử thấp bằng H₂O₂ cắt mạch oxi hóa dị thể chitosan:

Để thuận lợi cho quá trình hòa tan chitosan ban đầu có khối lượng phân tử (KLPT) lớn, trong nghiên cứu này, thực hiện xử lý chitosan ban đầu có KLPT ~171 kDa tạo chitosan KLPT thấp bằng phương pháp cắt mạch oxi hóa dị thể chitosan (CTS) bởi H₂O₂ theo như các công bố trước đây [15, 31, 88].

Cân một lượng xác định CTS, cho vào dung dịch 1% H₂O₂, theo tỉ lệ CTS/dung dịch là 1/10 (g/ml), điều chỉnh pH ~10 – 11 bằng NaOH 2M. Khuấy trộn đều bằng que khuấy và cách ~2 giờ khuấy đảo một lần. Phản ứng thực hiện ở nhiệt độ phòng ~28 – 35°C. Sau 24 giờ phản ứng, mẫu CTS được rửa sạch bằng nước cho đến pH ~7, rồi làm khô bằng tủ sấy quạt gió ở 60°C trong khoảng 2 giờ. Kết quả thu được CTS có KLPT thấp, dạng vảy màu vàng nhạt.

b) Chế tạo oligochitosan bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma Co⁶⁰ kết hợp H₂O₂ cắt mạch đồng thể dung dịch chitosan KLPT thấp:

Để thu được dung dịch oligochitosan (OC) có KPLT 2,5 kDa; 5,1 kDa và 7,8 kDa. Tiến hành thực hiện cắt mạch CTS KLPT thấp trong dung dịch có chứa H₂O₂ theo phản ứng cắt mạch đồng vận [26, 27, 89] với điều kiện cắt mạch cụ thể như sau:

+ Mẫu dung dịch 4% CTS/2% axit lactic: Hòa tan 40 g CTS KLPT thấp trong 1.000 ml dung dịch axit lactic 2% (v/v) (20 ml axit lactic đậm đặc 88% trong 980 ml nước), khuấy tan ở nhiệt độ thường và để yên qua đêm. Lọc lấy dung dịch CTS qua lưới thép không rỉ, loại 100 mesh, chuyển mẫu đi chiếu xạ gamma Co⁶⁰.

+ Mẫu dung dịch 4% CTS/2% axit lactic/0,5% H₂O₂: Hòa tan 40 g CTS KLPT thấp trong 985 ml dung dịch axit lactic 2% (v/v) (20 ml axit lactic đậm đặc 88% trong 965 ml nước), khuấy tan ở nhiệt độ thường và để yên qua đêm. Lọc lấy dịch lọc qua lưới thép không rỉ, loại 100 mesh. Bổ sung 15 ml H₂O₂ loại 30% vào dịch lọc, khuấy đều ở nhiệt độ phòng, ~10 phút. Chuyển mẫu đi chiếu xạ gamma Co⁶⁰.

+ Mẫu dung dịch 2% CTS/1% axit lactic/0,5% H₂O₂: Hòa tan 20 g CTS KLPT thấp trong 985 ml dung dịch axit lactic 1% (v/v) (10 ml axit lactic đậm đặc 88% trong 975 ml nước), khuấy tan ở nhiệt độ thường và để yên qua đêm. Lọc lấy dịch lọc qua lưới thép không rỉ, loại 100 mesh. Bổ sung 15 ml H₂O₂ loại 30% vào dịch lọc, khuấy đều ở nhiệt độ phòng, ~10 phút. Chuyển mẫu đi chiếu xạ gamma Co⁶⁰.

Các dung dịch mẫu được chiếu xạ theo liều cho đến 21 kGy, suất liều ~1,1 kGy/giờ, ở điều kiện thường trên máy chiếu xạ gamma Co⁶⁰ SVST Co-60/B. Liều hấp thụ (kGy) được xác định bởi hệ đo liều dichromate theo ISO/ASTM 51401:2003(E) [90].

c) *Chế tạo phức oligochitosan-Zn²⁺ bằng phương pháp phối trộn:*

Dung dịch phức oligochitosan-Zn²⁺ (OC-Zn²⁺) từ các oligochitosan (OC) có KLPT khác nhau (2,5 kDa; 5,1 kDa; 7,8 kDa) và tỷ lệ phần mol (-NH₂/Zn²⁺) khác nhau (1/0,25; 1/0,5; 1/1) được chế tạo bằng phương pháp phối trộn, phản ứng tạo phức thực hiện trong điều kiện thường [36, 37, 42, 91, 92].

Dung dịch OC nồng độ 2% và 4% sau chiếu xạ được điều chỉnh pH ~5,5 bằng dung dịch NH₄OH 5%. Cân lượng chính xác kẽm nitrate loại Zn(NO₃)₂·6H₂O (297,51 g/mol) cho vào dung dịch OC (Bảng 2.1), khuấy trên máy khuấy từ ở điều kiện thường để phản ứng tạo phức. Thời gian phản ứng 4 giờ.

Bảng 2.1: Số lượng muối kẽm Zn(NO₃)₂·6H₂O (g) cần thiết bổ sung vào 100 ml dung dịch OC để tạo phức đạt tỷ lệ phần mol (-NH₂/Zn²⁺) theo yêu cầu

Loại phức	Tỷ lệ mol (-NH ₂ /Zn ²⁺)	Nồng độ OC (g/100 ml)	ĐĐA %	n(-NH ₂) (mmol)	n(Zn ²⁺) (mmol)	Số lượng Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O
OC _{2,5} -Zn ²⁺	1/0,5	2	71,57	8,27	4,14	1,23
OC _{5,1} -Zn ²⁺	1/0,5	4	87,24	20,95	10,48	3,12
OC _{7,8} -Zn ²⁺	1/0,5	4	88,35	21,28	10,64	3,17
OC _{5,1} -Zn ²⁺	1/0,25	4	87,24	20,95	5,24	1,56
OC _{5,1} -Zn ²⁺	1/1	4	87,24	20,95	10,48	6,23

OC_{2,5}; OC_{5,1}; và OC_{7,8} tương ứng là OC có KLPT 2,5; 5,1; và 7,8 kDa. ĐĐA% là độ deacetyl của OC.

Số mol (-NH₂) phụ thuộc vào số lượng (gam) và độ deacetyl (ĐĐA%) của OC, được tính toán như sau:

$$n(-\text{NH}_2) = \text{ĐĐA}\% \times n(\text{OC}) \quad (2.1)$$

$$n(\text{OC}) = \text{OC (g)} / [\text{ĐĐA}\% \times 161,17 + (1 - \text{ĐĐA}\%) \times 203,21] \quad (2.2)$$

Trong đó: n là số mol; 161,17 và 203,21 là khối lượng phân tử mol (g/mol) tương ứng của monomer D-glucosamine (GluN) và N-acetyl-D-glucosamine (GluNAc) liên kết trong chuỗi phân tử OC [93].

+ Tạo mẫu bột khô OC và bột phức OC-Zn²⁺ để phân tích các đặc trưng: Bằng phương pháp tủa dung dịch mẫu với ethanol tuyệt đối [31, 94-96].

Dung dịch OC hoặc phức OC-Zn²⁺ được điều chỉnh pH ~9 bằng NH₄OH 5%. Sau đó cho ethanol vào dung dịch mẫu với tỷ lệ thể tích: 1v mẫu/8v ethanol, khuấy đều 10 phút. Chuyển mẫu vào ngăn đông tủ lạnh, giữ yên qua đêm. Lọc lấy tủa bằng màng lọc sợi thủy tinh whatman và rửa tủa bằng ethanol tuyệt đối đến pH trung tính. Sấy tủa trong tủ sấy quạt gió ở 60°C đến khối lượng không đổi. Nghiền tủa trên máy nghiền bi Fritsch. Thu được mẫu OC hoặc phức OC-Zn²⁺ dạng bột mịn.

d) Đo phổ hấp thụ ánh sáng vùng tử ngoại - khả kiến – UV-Vis:

Đặc trưng hấp thụ ánh sáng quang học của dung dịch OC và phức OC-Zn²⁺ được đo trên máy quang phổ UV-Vis, Jasco V630. Trước khi đo, các mẫu được pha loãng bằng nước đạt nồng độ OC 0,1% [41, 89, 97, 98], dùng cuvet thạch anh, sử dụng dung dịch axit lactic 0,05% làm dung môi tham chiếu, quét phổ trong khoảng bước sóng 200 – 800 nm.

e) Đo phổ sắc ký gel thấm qua – GPC:

Cho đến nay, dùng kỹ thuật đo phổ GPC để xác định KLPT của CTS và các dẫn xuất được áp dụng phổ biến. KLPT của CTS và OC trong nghiên cứu này được xác định trên máy GPC, LC – 20AB Shimadzu, sử dụng detector RID –10A và cột Ultrahydrogel 250 hãng Waters, kích thước cột 7,8 × 300 mm. Dùng chất chuẩn là pullulan với KLPT biết trước, sử dụng dung môi hòa tan là đệm acetate CH₃COOH 0,25M/CH₃COONa 0,25M, pH 4 [26, 27, 99, 100], các bước tiến hành như sau:

+ Lập đường chuẩn: Hòa tan hoàn toàn 0,01 g các mẫu chuẩn pullulan có Mw 738 – 380.000 Da trong 2 ml dung môi CH₃COOH 0,25M/CH₃COONa 0,25M. Lọc qua màng millipore PTFE 0,45 μm. Tiêm 50 μl mẫu vào cột sắc ký, hoạt động trong điều kiện nhiệt độ lò cột là 40°C, tốc độ dòng chảy là 1 ml/phút, pha động là dung môi CH₃COOH 0,25M/CH₃COONa 0,25M. Từ các kết quả thời gian lưu (t_r, phút) của các mẫu chuẩn trên giản đồ GPC, lập được đường chuẩn từ mối tương quan giữa thời gian lưu (t_r) và KLPT (logMw) của chất chuẩn pullulan tương ứng.

+ Đo mẫu: Hòa tan hoàn toàn 0,25 g mẫu bột CTS hoặc OC vào 50 ml đệm CH₃COOH 0,25M/CH₃COONa 0,25M, để ổn định khoảng 4 giờ, lọc qua màng millipore PTFE 0,45 μm. Tiến hành tiêm dung dịch mẫu với thể tích và các điều kiện khác như đã thực hiện đối với mẫu chuẩn pullulan. Xác định thời gian lưu và dựa vào đường chuẩn để xác định KLPT của mẫu cần đo bao gồm KLPT trung bình khối lượng (Mw) và KLPT trung bình số lượng (Mn).

Từ các giá trị KLPT thu được và sự thay đổi KLPT của mẫu CTS sau xử lý cắt mạch, chỉ số đa phân tán KLPT (PI) và hiệu suất cắt mạch bức xạ (Gs) được tính toán như sau [9, 26, 27, 101]:

$$PI = M_w/M_n, \quad PI \text{ càng gần } 1 \text{ thì phân bố KLPT càng hẹp} \quad (2.3)$$

$$(1/M_w - 1/M_w0) = G_s \times D \times d \times 1000 / 2 \times C \quad (2.4)$$

Trong đó: M_w0 , M_w lần lượt là KLPT của CTS ban đầu và CTS sau cắt mạch; D là liều xạ (kGy); d là khối lượng riêng của dung dịch CTS (g/ml), C là nồng độ dung dịch CTS (g/l); và G_s (mol/J) là hiệu suất cắt mạch bức xạ (giá trị G_s càng lớn thì hiệu quả cắt mạch càng cao).

f) Đo phổ hấp thụ hồng ngoại – FTIR:

Quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) là công cụ hữu ích dùng phân tích cấu trúc hóa học của chất hữu cơ. Dựa trên hiện tượng hấp thụ ánh sáng vùng hồng ngoại chuyển thành các dao động phân tử, các dao động này phản ánh đặc trưng bản chất của các liên kết hóa học trong mẫu. Phổ FTIR được sử dụng phổ biến để đánh giá cấu trúc hóa học của chitosan, các dẫn xuất và của phức [102-104], đồng thời qua đó còn tính được giá trị độ deacetyl (ĐĐA%) của chúng [7, 27].

Nghiền trộn đều 3 – 5 mg bột CTS, OC hoặc bột phức OC-Zn²⁺ với 200 mg KBr bằng bộ cối – chày mã não, ép tạo viên trên máy thủy lực trong 10 phút dưới áp suất nén 3000 Psi. Phổ FTIR được ghi trên máy FT-IR 8400S, trong dải số sóng 800 – 4000 cm⁻¹, thực hiện quét 40 lần với độ phân giải 4 cm⁻¹, dùng viên KBr để cân bằng tín hiệu nền (balance) trước khi ghi phổ mẫu.

Dựa vào cường độ của các đỉnh hấp thụ đặc trưng tại 1420 cm⁻¹ (đặc trưng dao động liên kết C–H của –CH₂ và –CH₃) và 1320 cm⁻¹ (đặc trưng dao động của amide III trên đơn vị N-acetyl-D-glucosamine), giá trị ĐĐA% được tính theo phương trình của Brugnerotto và cộng sự (2001) [7] như sau:

$$A_{1320}/A_{1420} = 0,3822 + 0,0313 \times (100 - \text{ĐĐA}\%) \quad (2.5)$$

Trong đó: A_{1320} và A_{1420} là cường độ hấp thụ tương ứng tại đỉnh 1320 và 1420 cm⁻¹.

g) Đo phổ cộng hưởng từ proton – ¹H NMR:

Sử dụng phổ ¹H NMR để xác định ĐĐA% hay hàm lượng phần trăm của D-glucosamine trong phân tử CTS, OC được đánh giá là một kỹ thuật có độ chính xác cao và đã được sử dụng rộng rãi [105-107].

Tiến hành, hòa tan 50 mg bột OC trong 0,5 ml dung dịch 2% CD₃COOD/D₂O,

đưa dung dịch vào ống đo đường kính 5 mm ở nhiệt độ 70°C. Phổ proton được ghi lại trên máy Bruker AVANCE III 500 spectrometer, Bruker BioSpin AG, đầu dò BBO. Dựa vào diện tích tích phân cường độ tín hiệu cộng hưởng của các proton, giá trị ĐDA% của các mẫu OC được tính theo phương trình sau [9, 100, 105, 108]:

$$\text{ĐDA}(\%) = [1 - (I_{\text{CH}_3} \times 1/3) : (I_{\text{H}_2-\text{H}_6} \times 1/6)] \times 100 \quad (2.6)$$

Trong đó: I_{CH_3} là diện tích tích phân cường độ các proton của nhóm $-\text{CH}_3$ trên monomer N-acetyl-D-glucosamine, $I_{\text{H}_2-\text{H}_6}$ tổng diện tích tích phân cường độ của các proton $\text{H}_2, \text{H}_3, \text{H}_4, \text{H}_5, \text{H}_6$.

h) Đo giản đồ nhiễu xạ tia X – XRD:

Giản đồ nhiễu xạ tia X được sử dụng phổ biến để phân tích trạng thái cấu trúc kết tinh của CTS, OC và phức của chúng với ion kim loại [37, 75, 96, 108]. Giản đồ XRD của các mẫu bột mịn CTS, OC và phức OC-Zn^{2+} sau khi ép thành dạng màng hình tròn, độ dày ~0,5 mm, được đo trên máy XRD Siemens D5000, Đức, sử dụng ống phát tia X Cu-K α (1,54 Å), điện áp 40 kV, cường độ dòng ống phát 40 mA, góc quét 2θ thay đổi từ 0 – 80°, tốc độ quét 2°/phút.

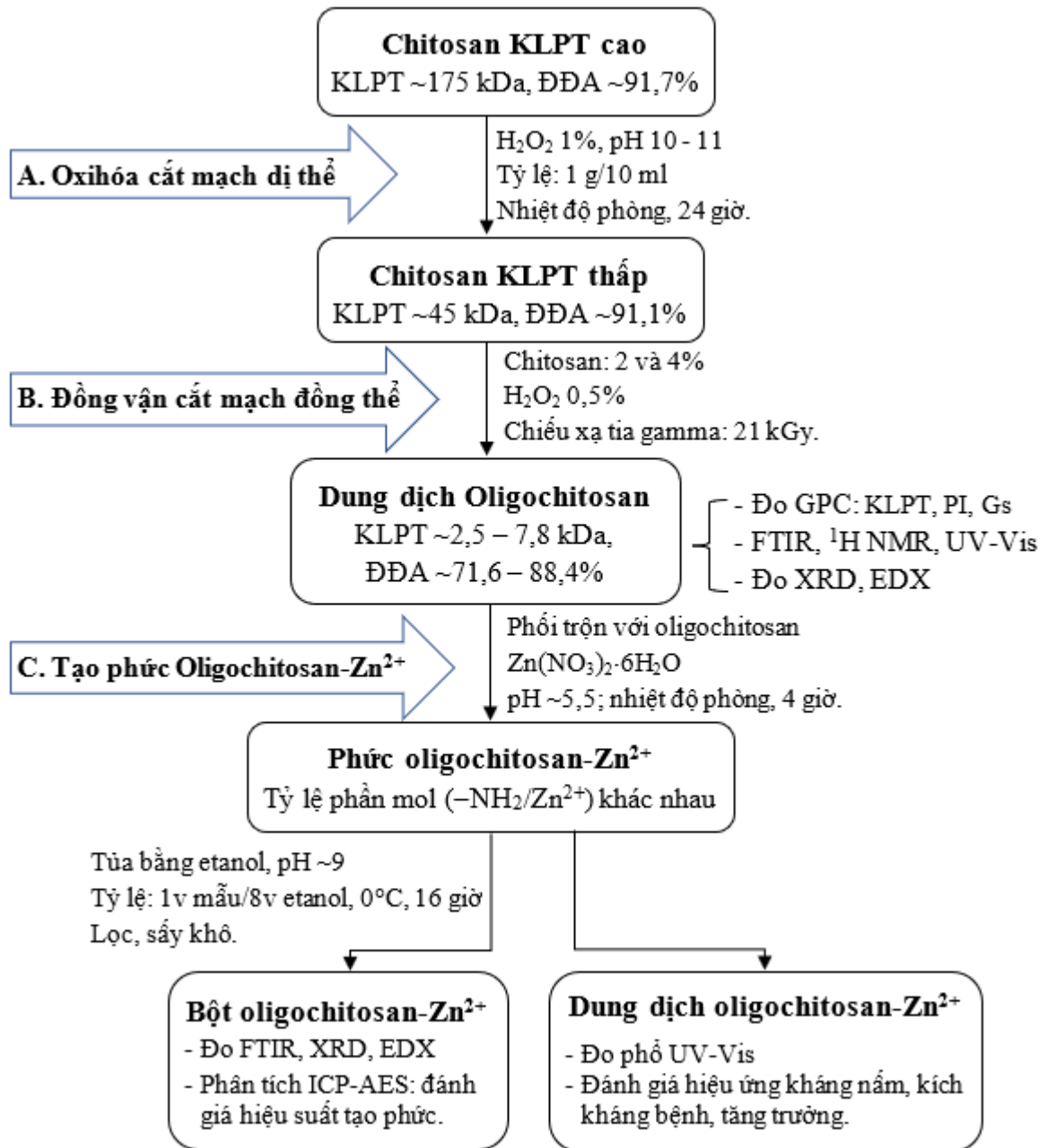
i) Đo phổ tán sắc năng lượng tia X – EDX:

Phổ tán sắc năng lượng tia X (EDX) là kỹ thuật thường được sử dụng để phân tích định tính và bán định lượng thành phần nguyên tố trong mẫu. Nguyên lý của phương pháp là khi chùm điện tử năng lượng cao bắn vào vật rắn sẽ tương tác với các điện tử ở lớp trong của các nguyên tử, tương tác này dẫn đến phát xạ tia X với tần số đặc trưng cho mỗi nguyên tố. Ghi nhận phổ phát xạ tia X cho biết thông tin về thành phần nguyên tố và tỷ lệ phần trăm của các nguyên tố có mặt trong mẫu [109]. Các mẫu bột OC và phức OC-Zn^{2+} được nén thành dạng màng hình tròn, độ dày ~0,1 mm và được phủ lớp platin nhằm tăng độ dẫn [96, 110]. Thành phần nguyên tố và tỷ lệ khối lượng trong mẫu được xác định trên máy đo EDX, JEOL 6610 LA gắn cùng thiết bị FE-SEM, S-4800, Hitachi, ghi dữ liệu trong dải điện thế 0 – 20 keV.

j) Đo quang phổ phát xạ nguyên tử cảm ứng plasma – ICP-AES:

Phổ phát xạ nguyên tử cộng hưởng plasma (Inductively coupled plasma - atomic emission spectroscopy) là một công cụ phân tích thành phần kim loại trong hỗn hợp có độ nhạy cao [91, 96], đối với kẽm giới hạn phát hiện 2,5 ppm. Bột phức OC-Zn^{2+} được hòa tan trong dung dịch HNO_3 rồi bơm vào máy để ion hóa kết hợp khí plasma argon, dưới trường nhiệt độ cao ~8.000°C, nguyên tử kẽm bị kích thích và phát xạ ánh sáng đặc trưng. Hàm lượng kẽm (mg/g) trong phức OC-Zn^{2+} được xác

định trên máy ICP-AES, hãng PerkinElmer, model Optima 5300DV, Mỹ, theo phương pháp AOAC 2016 (990.08). Kết quả thu được so sánh với tính toán lý thuyết để đánh giá hiệu suất tạo phức [42, 96]. Toàn bộ quá trình chế tạo mẫu OC, phức OC-Zn²⁺ và xác định các đặc trưng tính chất hóa lý được tóm tắt trên **Hình 2.1**.



Hình 2.1: Sơ đồ mô tả tóm tắt phương pháp chế tạo và đánh giá các đặc trưng tính chất của oligochitosan và phức oligochitosan-Zn²⁺

2.2.2. Xác định hiệu lực ức chế nấm *Colletotrichum truncatum* trong điều kiện phòng thí nghiệm (*in vitro*)

Hiệu lực ức chế (AE%) nấm *C. truncatum* của các mẫu Zn²⁺, OC, và phức OC-Zn²⁺ được đánh giá theo phương pháp gây độc môi trường [37, 111-114].

Hòa tan 39 g môi trường PDA trong 800 ml nước. Bổ sung các dung dịch OC, phức OC-Zn²⁺ vào dung dịch môi trường PDA để đạt được nồng độ OC cuối cùng là 250, 500 và 1000 mg OC/lít (~ppm) và một mẫu bổ sung muối kẽm nitrate đạt nồng độ Zn²⁺ tương đương với lượng Zn²⁺ trong phức OC-Zn²⁺ pha loãng. Điều chỉnh pH 5,5 – 6 bằng NaOH 1N, làm đầy dung dịch môi trường bằng nước đến thể tích 1 lít. Sau đó, các dung dịch môi trường PDA có và không có chất thử nghiệm được hấp khử trùng trong 15 phút ở 121°C. Đợi khi nhiệt độ môi trường giảm còn ~50°C, tiến hành rót 15 ml các dung dịch môi trường vào mỗi đĩa petri có đường kính 90 mm và giữ cho đông rắn. Dùng dụng cụ chuyên dụng hình tròn có đường kính 6 mm lấy mẫu giống sợi nấm *C. truncatum* phát triển trên đĩa PDA. Đặt mẫu nấm ở giữa tâm các đĩa thạch PDA chứa các chất thử nghiệm khác nhau. Mỗi 1 nghiệm thức bao gồm 5 đĩa. Các đĩa này được nuôi ủ ở 28 ± 2°C trong 5 – 10 ngày cho đến khi sợi nấm *C. truncatum* chạm tới các cạnh thành của đĩa đối chứng (PDA không bổ sung chất thử). Đo đường kính của các tầng sợi nấm trên các đĩa thạch, và hiệu lực ức chế nấm (AE%) được tính như sau [111, 114-116]:

$$AE\% = (Dc - Ds) \times 100/Dc \quad (2.7)$$

Trong đó: Dc và Ds lần lượt là đường kính tầng sợi nấm (mm) tương ứng của mẫu đối chứng và mẫu thử.

2.2.3. Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh thán thư và các chỉ tiêu sinh trưởng của phức oligochitosan-Zn²⁺ trên cây đậu nành trong điều kiện nhà kính



Hình 2.2: Cây đậu nành thí nghiệm trong nhà kính

Hạt giống đậu nành HL 07-15 được xử lý vô trùng bề mặt bằng cách ngâm 5 phút trong dung dịch 0,1% HgCl₂, rồi rửa sạch bằng nước vô trùng [65]. Sau đó gieo

9 hạt trong các chậu nhựa, đường kính 30 cm chứa giá thể hữu cơ gồm xơ dừa, tro trấu, phân trùn quế. Cây đậu nành 1 tuần tuổi, có 2 lá mầm, tía bỏ và giữ lại 4 cây/chậu có chiều cao và kích thước đồng đều. Cây con được trồng trong nhà kính với hệ thống tưới nhỏ giọt tự động tại Trung tâm AHRD. Thời điểm thực hiện thí nghiệm từ năm 2017 – 2020. Các nghiệm thức được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) với 3 lần lặp lại và mỗi lần lặp gồm 10 chậu đặt cách nhau 30 cm (Hình 2.2).

Cây đậu nành được phun qua lá các dung dịch mẫu thử gồm muối kẽm nitrate, OC, phức OC-Zn²⁺ được pha loãng với nước đến nồng độ thiết lập (tính trên cơ sở nồng độ của OC). Phun qua lá bằng bình phun cầm tay được thực hiện 3 lần vào các ngày thứ 15, 25 và 35 sau khi gieo hạt với lượng dung dịch phun tương ứng với từng thời điểm lần lượt là 0,5; 0,75; và 1 lít/nghiệm thức. Sau lần phun thứ ba 24 giờ, cây đậu nành được phun dung dịch huyền phù bào tử nấm *C. truncatum* với mật độ ~10⁵ bào tử/ml và lượng phun 1 lít/nghiệm thức để chủng bệnh thán thư cho cây đậu nành.

Dung dịch huyền phù bào tử nấm *C. truncatum* được chuẩn bị như sau [65, 78]: Cho ~10 ml nước cất vô trùng vào đĩa nấm *C. truncatum* đã nuôi 10 ngày trên môi trường PDA, dùng lam kính vô trùng gạt lấy bào tử nấm, lọc qua vải vô trùng, thu dịch chứa bào tử nấm. Đếm số lượng bào tử bằng buồng đếm hồng cầu Neubauer haemocytometer, dùng nước cất vô trùng để pha loãng và điều chỉnh mật độ bào tử đạt ~10⁵ bào tử/ml [32, 113, 115]. Trong công trình nghiên cứu này thực hiện 03 thí nghiệm cụ thể như sau:

+ *Thí nghiệm 1*: Khảo sát ảnh hưởng của phức OC-Zn²⁺ theo KLPT của OC. Bao gồm 05 nghiệm thức, phun phức ở nồng độ 50 mg/lít (~ppm) (tính trên cơ sở nồng độ OC) – dựa trên cơ sở kết quả công bố của Zhao và cộng sự (2016) [117].

1. Đối chứng: Phun nước – Không phun bệnh.
2. Đối chứng (+): Phun nước – Phun bệnh.
3. Phun phức OC7,8-Zn²⁺ – Phun bệnh.
4. Phun phức OC5,1-Zn²⁺ – Phun bệnh.
5. Phun phức OC2,5-Zn²⁺ – Phun bệnh.

+ *Thí nghiệm 2*: Khảo sát ảnh hưởng của phức OC-Zn²⁺ theo nồng độ. Bao gồm 05 nghiệm thức với nồng độ (tính trên cơ sở nồng độ OC) khác nhau

1. Đối chứng: Phun nước – Không phun bệnh.
2. Đối chứng (+): Phun nước – Phun bệnh.
3. Phun phức OC5,1-Zn²⁺ (25 ppm) – Phun bệnh.
4. Phun phức OC5,1-Zn²⁺ (50 ppm) – Phun bệnh.
5. Phun phức OC5,1-Zn²⁺ (100 ppm) – Phun bệnh.

+ *Thí nghiệm 3*: Đánh giá hiệu lực tác động đồng vận (synergistic effect) của phức OC-Zn²⁺. Bao gồm 05 nghiệm thức

1. Đối chứng: Phun nước – Không phun bệnh.
2. Đối chứng (+): Phun nước – Phun bệnh.
3. Phun Zn²⁺ (8,75 ppm) – Phun bệnh.
4. Phun OC5,1 (50 ppm) – Phun bệnh.
5. Phun phức OC5,1-Zn²⁺ (50 ppm) – Phun bệnh.

Ghi chú: Nghiệm thức đối chứng (+) dùng để đánh giá mức độ miễn cảm của giống đậu nành H 07-15 đối với nấm *C. truncatum* thông qua chỉ số bệnh, tỷ lệ bệnh thán thư và hoạt tính enzyme chitinase sau khi gây nhiễm bệnh nhân tạo.

Các chỉ tiêu theo dõi:

a) Đo hàm lượng chlorophyll tổng số:

Tổng hàm lượng chlorophyll của lá cây đậu nành tại thời điểm sau ngày thứ 36 sau gieo (sau phun thuốc thử lần 3 và trước khi phun bệnh) được xác định theo phương pháp Arnon – 1949. Cụ thể, lấy ngẫu nhiên 3 lá thật/cây và lấy mẫu lá trên 3 cây của mỗi nghiệm thức, cắt nhỏ, trộn đều. Cân 5 g mô lá, nghiền trong cối sứ, chiết bằng 50 ml dung môi acetol 80% để lạnh (4°C). Ly tâm 5.000 vòng/phút, trong 10 phút, thu dịch chiết. Để dịch chiết ổn định ở điều kiện phòng trong 5 phút, đo mật độ quang trên máy UV-Vis tại bước sóng 663 nm (đặc trưng cho chlorophyll *a*) và 645 nm (đặc trưng cho chlorophyll *b*), sử dụng dung môi acetol 80% làm đối chứng tham chiếu. Hàm lượng chlorophyll tổng số được tính theo phương trình sau [74, 118-120]:

$$\text{Chlorophyll tổng (mg/g)} = [20,2 \times (\Delta A_{645}) - 8,02 \times (\Delta A_{663})] \times V / (1000 \times W) \quad (2.8)$$

Trong đó: ΔA là độ hấp thụ quang học tại bước sóng tương ứng; V (ml) là thể tích dịch chiết; W (g) là khối lượng mô lá tươi dùng để chiết.

b) Đo chiều cao cây:

Chiều cao cây đậu nành thí nghiệm tại thời điểm 36 ngày sau gieo được đo bằng thước dây có độ chia nhỏ 1 mm, đo ngẫu nhiên 5 cây/nghiệm thức, đo từ phần gốc trên mặt đất đến đỉnh lá cao nhất của cây [121].

c) Đo hàm lượng tích lũy chất khô:

Lấy 5 cây đậu nành thí nghiệm trong cùng nghiệm thức tại thời điểm 36 ngày sau gieo, cắt bỏ phần rễ, sấy khô trong tủ sấy quạt gió DNF 410, Yamato, ở 65°C đến khối lượng không đổi, cân tính hàm lượng tích lũy chất khô (g/cây) [118, 121].

d) *Đo hoạt tính enzyme chitinase:*

Đối với thực vật, chitinase được xếp vào loại protein liên quan sinh lý bệnh (PR-protein) có vai trò quan trọng tham gia vào cơ chế phòng vệ chống lại mầm bệnh có chứa chitin. Chitinase thực vật có thể được kích tạo bởi nhiều tác nhân và nó có khả năng thủy phân chitin thành chito oligomer và monomer N-acetyl-D-glucosamine (GluNAc) [122]. Hoạt tính enzyme chitinase của lá cây đậu nành thí nghiệm được xác định bằng phương pháp đo màu dung dịch phản ứng đường khử với thuốc thử DNS tại bước sóng 540 nm [51, 123-125].

Một đơn vị hoạt tính chitinase (1U) được định nghĩa là lượng enzyme chitinase cần thiết để chuyển hóa cơ chất huyền phù chitin thành 1 μmol đường khử GluNAc trong 1 phút phản ứng [80, 122].

+ Tạo huyền phù chitin 1%: Theo phương pháp được mô tả bởi *Zhang và cộng sự* (2013) với một số thay đổi nhỏ. Cụ thể, hòa tan 5 g chitin trong 50 ml HCl đậm đặc, khuấy trong 4 giờ, nhiệt độ phòng. Sau đó, cho 450 ml ethanol được làm lạnh 4°C vào dung dịch chitin, xuất hiện tủa trắng. Giữ hỗn dịch tủa trong tủ lạnh 4°C qua đêm. Ly tâm 5.000 vòng/phút, trong 10 phút để thu tủa chitin, tiếp tục bổ sung nước lạnh 4°C và ly tâm rửa tủa cho đến pH trung tính. Phân tán chitin và định mức đến 500 ml với đệm natri phosphat 0,1 M (pH 7), thu được huyền phù chitin 1% [122].

+ Tạo thuốc thử DNS: Theo mô tả *Miller 1959* [123], chuẩn bị như sau:

- Dung dịch A: Hòa tan 300 g muối Na-K tartrat (Rochell) vào 500 ml nước cất.
- Dung dịch B: Hòa tan 10 g 3,5- Dinitrosalicylic acid + 200 ml NaOH 2M.
- Dung dịch C: Hòa tan 2 g phenol + 0,5 g sodium bisulfit vào 100 ml nước cất.

Thuốc thử DNS dùng trong phản ứng: Trộn dung dịch A vào B rồi vào C, khuấy trộn ở nhiệt 70°C trong 1 giờ, không để hóa nâu, định mức bằng nước đến 1 lít. Chỉ pha dung dịch thuốc thử DNS dùng cho phản ứng trước khi sử dụng, bảo quản không quá 4 tháng trong chai nâu và tránh không khí.

Bảng 2.2: Thành phần tác nhân tạo phản ứng đường khử theo nồng độ chất chuẩn GluNAc ($\mu\text{mol/ml}$)

Nồng độ GluNAc ($\mu\text{mol/ml}$)	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Dung dịch Stock GluNAc (ml)	0	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2
Đệm natri phosphat 0,1M, pH 7 (ml)	4	3,8	3,6	3,2	2,8	2,4	2
Dung dịch NaOH 2M (ml)	2	2	2	2	2	2	2

+ Lập đường chuẩn N-acetyl-D-glucosamine (GluNAc): Cân chính xác 4,424 mg chất chuẩn N-acetyl-D-glucosamine hòa tan trong 10 ml đệm natri phosphat 0,1M pH 7 tạo dung dịch cái (stock) nồng độ 2 $\mu\text{mol/ml}$. Dụng lại đường chuẩn mỗi khi pha lại thuốc thử DNS. Từ dung dịch stock, pha các dung dịch GluNAc theo dãy nồng độ từ 0 – 1 $\mu\text{mol/ml}$ và thực hiện phản ứng đường khử cụ thể như [Bảng 2.2](#).

Lắc trộn đều, tại mỗi nồng độ rút dung dịch chia đều cho 2 ống nghiệm (3 ml/ống nghiệm); thêm 1 ml thuốc thử DNS vào mỗi ống, lắc đều, đun sôi cách thủy trong 10 phút. Làm nguội, đo OD trên máy UV-Vis, Jasco V630 tại bước sóng 540 nm. Lập đường chuẩn theo giá trị tương quan giữa nồng độ GluNAc và ΔOD_{540} .

+ Chiết mẫu enzyme chitinase: Dịch enzyme chitinase thô từ lá cây đậu nành thí nghiệm chiết bằng đệm natri phosphat 0,1 M (pH 7) được thực hiện dựa theo các công bố trước đây [78, 79, 87, 125], với một số thay đổi nhỏ. Cụ thể, lấy lá ngẫu nhiên trên 3 cây trong cùng nghiệm thức (mỗi cây lấy 3 lá thật ở các tầng khác nhau), cắt nhỏ, trộn đều. Cân 5 g mô lá cho vào bộ chày cối sứ để nghiền mô, bổ sung bột thủy tinh nhằm tăng hiệu quả nghiền. Sau đó cho thêm 30 ml đệm vào cối, tiếp tục dùng chày nghiền nát mô trong 30 phút, chuyển toàn bộ mẫu mô nghiền sang cốc thủy tinh, dùng thêm 20 ml đệm để tráng sạch phần dịch nghiền trên bộ chày cối sứ. Để yên dịch mô trong 1 giờ nhằm trích ly protein enzyme, sau đó ly tâm 10.000 vòng/phút ở 4°C, trong 10 phút trên máy siêu ly tâm Ultra 5.0 để lấy toàn bộ dịch chiết lá. Tủa toàn bộ dịch chiết lá với ethanol lạnh với tỷ lệ thể tích 1v dịch chiết/5v ethanol, ly tâm 10.000 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C trong 10 phút để loại phân đường hòa tan trong đệm. Lấy toàn bộ phần protein tủa sau ly tâm cho phân tán và định mức trong 10 ml đệm natri phosphat pH 7 [125]. Như vậy, kết quả thu được 10 ml dịch enzyme chitinase thô được chiết từ 5 g mô lá để tiến hành thử hoạt tính enzyme.

+ Đo mẫu: Lấy 2 ml dịch enzyme thô vào ống nghiệm chứa sẵn 2 ml dịch huyền phù chitin 1%. Hỗn hợp này được ủ lắ ở 45°C trong 3 giờ. Mẫu đối chứng chứa 2 ml dịch huyền phù chitin 1% và 2 ml dịch enzyme thô đã bị đun sôi cách thủy trong 10 phút trước đó (để bất hoạt enzyme). Sau 3 giờ ủ, các ống nghiệm được đun sôi cách thủy trong 5 phút để dừng phản ứng enzyme, làm nguội nhanh và thêm 2 ml dung dịch NaOH 2M vào mỗi ống. Tiến hành ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để loại cặn, thu dịch chứa đường khử. Sau đó, hút từ mỗi ống 3 ml dịch ly tâm, thêm 1 ml thuốc thử DNS, đun sôi cách thủy trong 10 phút để phản ứng đường khử tạo màu. Sau 10 phút để nguội, các ống nghiệm chứa mẫu được đo mật độ quang (OD) trên máy UV-Vis ở bước sóng 540 nm, sử dụng cuvet thạch anh 1x1 cm.

Tính $\Delta\text{OD}_{540} = \text{OD}_{540} \text{ mẫu thử} - \text{OD}_{540} \text{ mẫu đối chứng}$, và xác định số μmol

GluNAc theo phương trình đường chuẩn. Xác định hoạt tính enzyme chitinase (CA, U/g lá tươi) theo các phương trình sau [87, 125]:

$$\text{Hoạt tính chung (U)} = (X \times a \times V)/(v \times t) \quad (2.9)$$

$$\text{CA (U/g lá tươi)} = U/k \quad (2.10)$$

Trong đó: X là số μmol GluNAc suy ra từ đường chuẩn; V là tổng thể tích hỗn hợp phản ứng enzyme (4 ml); v là thể tích dịch enzyme thô đem phân tích (2 ml); a là hệ số pha loãng mẫu enzyme thô (1); t là thời gian phản ứng (180 phút); k là lượng mô lá dùng để chiết trong 1 ml dịch enzyme thô (5 g lá/10 ml).

e) *Đo tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh:*

Các cây đậu nành thí nghiệm tại thời điểm 21 ngày sau chủng bệnh (ngày thứ 56 sau gieo - giai đoạn hoa nở rộ). Tiến hành điều tra theo dõi tỷ lệ bệnh (DI%) và chỉ số bệnh (DS%) của 30 cây/nghiệm thức. Xác định giá trị DI% và DS% theo các phương trình sau [65, 112, 126, 127]:

$$\text{DI\%} = \frac{\text{Tổng số cây bị bệnh}}{\text{Tổng số cây theo dõi}} \times 100 \quad (2.11)$$

$$\text{DS\%} = \frac{[(N_1 \times 1) + (N_2 \times 2) + \dots + (N_n \times n)]}{N \times n} \times 100 \quad (2.12)$$

Trong đó: + N_1, N_2, \dots, N_n : Số lá nhiễm bệnh ở mỗi cấp 1, 2, ..., n;

+ N: Tổng số lá điều tra;

+ n: Cấp bệnh cao nhất; Với Cấp 0: không có lá bệnh; Cấp 1: > 0 % đến 10 % diện tích lá bị bệnh; Cấp 2: > 10 % đến 20 % diện tích lá bị bệnh; Cấp 3: > 20 % đến 60 % diện tích lá bị bệnh; Cấp 4: > 60 % đến 80 % diện tích lá bị bệnh; Cấp 5: > 80 % diện tích lá bị bệnh.

Tất cả các số liệu thu được từ phân tích và thực nghiệm khảo sát hiệu lực sinh học trong *in vitro*, và nhà kính được xử lý thống kê bằng phương pháp phân tích khác biệt phương sai (ANOVA). Các giá trị được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (SD) của ít nhất 3 lần lặp [77] và trắc nghiệm phân hạng LSD với mức xác suất tin cậy $p < 0,05$ từ phần mềm MSTATC, version 1.2, Đại học bang Michigan (MSU), Mỹ phát hành 1989.

2.2.4. Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh và hiệu lực nông học của phức oligochitosan-Zn²⁺ đối với cây đậu nành trên ruộng thí nghiệm

Thực hiện theo quy trình kỹ thuật, phương pháp đánh giá và tư vấn của đơn vị thực nghiệm là Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Nông nghiệp Hưng Lộc, xã Hưng Thịnh, huyện Trảng Bom, tỉnh Đồng Nai.

+ *Vật liệu nghiên cứu*

- Đất nghiên cứu: Đất đỏ Bazan.
- Giống đậu nành: HL 07-15
- Phân bón gốc (Nền): Urea: 46% N; Super lân: 16% P₂O₅; KCl: 60% K₂O
- Sản phẩm thử nghiệm: Dung dịch Oligochitosan (OC 5,1 kDa) và phức Oligochitosan-Zn²⁺ (OC 5,1 kDa, tỷ lệ phần mol 1/0,5) dùng phun qua lá.
- Địa điểm thí nghiệm: Tại ruộng thí nghiệm, Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Nông nghiệp Hưng Lộc, xã Hưng Thịnh, huyện Trảng Bom, tỉnh Đồng Nai.



Hình 2.3: Cây đậu nành trồng trên ruộng thí nghiệm

+ *Phương pháp nghiên cứu*

- Phương pháp bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo thể thức khối đầy đủ hoàn toàn ngẫu nhiên (RCBD), mỗi khảo nghiệm gồm 3 nghiệm thức, với 3 lần lặp lại, diện tích ô thí nghiệm là 30 m²/ô. (Hình 2.3)
- Công thức thí nghiệm
 1. Phun nước (ĐC)
 2. Phun oligochitosan
 3. Phun phức oligochitosan-Zn²⁺

Nền: (30 kg N + 50 kg P₂O₅ + 40 kg K₂O)/ha/vụ

- Thời gian nghiên cứu: từ tháng 12/2020 đến tháng 03 năm 2021.
- Mật độ gieo: 40 cm × 20 cm (gieo 3 hạt trên một hốc)
- Phương pháp xử lý: Dung dịch oligochitosan và phức oligochitosan-Zn²⁺ được phun với nồng độ 50 ppm (mg/lít) tính trên cơ sở nồng độ của oligochitosan, phun 03 lần vào các thời điểm sau:
 - + Lần 1: 15 ngày sau gieo
 - + Lần 2: 25 ngày sau gieo
 - + Lần 3: 35 ngày sau gieo

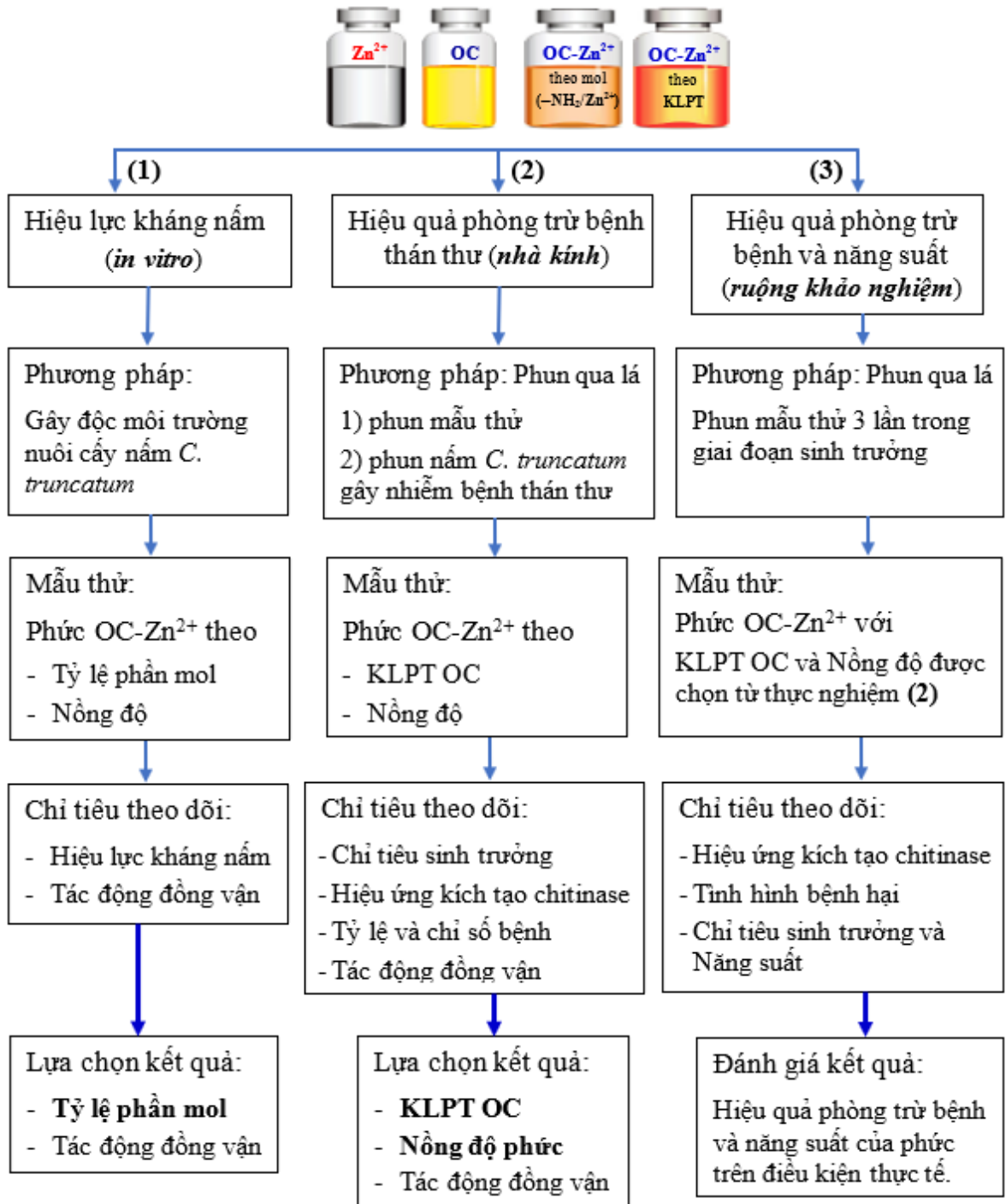
Các biện pháp kỹ thuật khác (làm đất, tưới nước, bón phân khoáng, giống, phòng trừ sâu bệnh, làm cỏ, áp dụng theo quy trình phổ biến tại địa phương nơi thí nghiệm và thống nhất cho các nghiệm thức khảo nghiệm.

- Chỉ tiêu và phương pháp theo dõi
 - + Hoạt tính enzyme chitinase trong lá cây đậu nành. Lấy mẫu chuyển đến Phòng thí nghiệm, Trung tâm VINAGAMMA, TP. HCM để phân tích.
 - + Nhận xét về tình hình sinh trưởng, phát triển của cây trồng khảo nghiệm và mức độ nhiễm sâu bệnh hại. Theo QCVN 01 - 168: 2014/BNNPTNT [128]. Trong đó,

$$\text{Tỷ lệ cây bị bệnh sâu cuốn lá} = \frac{\text{Tổng số cây bị sâu cuốn lá}}{\text{Tổng số cây điều tra}} \times 100 \quad (2.13)$$

- + Theo dõi các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất thực thu [129].
- + Tính năng suất, hiệu suất sử dụng chế phẩm, hiệu quả kinh tế [130].
 - Bội thu năng suất (tạ/ha) = Năng suất công thức chế phẩm khảo nghiệm – Năng suất công thức đối chứng.
 - Hiệu quả kinh tế: Lợi nhuận = (Năng suất × giá nông sản) – Tổng chi phí.
- Phương pháp xử lý số liệu: Các số liệu thu được từ thí nghiệm trên đồng ruộng được phân tích bằng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) và trắc nghiệm phân hạng LSD bằng phần mềm MSTATC, version 1.2, Đại học bang Michigan (MSU), Mỹ phát hành 1989.

Các nội dung nghiên cứu đánh giá hiệu ứng sinh học về hiệu lực ức chế nấm *C. truncatum*, hiệu quả kích tạo chitinase và phòng trừ bệnh thán thư; và khảo nghiệm hiệu quả phòng trừ bệnh hại, tác động năng suất đậu nành của OC, phức OC-Zn²⁺ được mô tả trên [Hình 2.4](#).



Hình 2.4: Sơ đồ tóm tắt thực nghiệm đánh giá hiệu ứng sinh học của phức oligochitosan-Zn²⁺

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chế tạo oligochitosan khối lượng phân tử 2 – 8 kDa

3.1.1. Oxi hóa cắt mạch dị thể giảm khối lượng phân tử chitosan

Thông thường dẫn xuất chitosan thu được từ phản ứng deacetyl của chitin vỏ tôm, cua,.. trong kiềm đặc nóng, có khối lượng phân tử (KLPT) lớn hơn 100 kDa và độ nhớt cao [100] nên khó hòa tan trong dung dịch các axit hữu cơ (acetic, lactic,..) để tạo dung dịch chitosan với nồng độ cao hơn 3% (w/v) [27]. Theo các kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy rằng, sử dụng H_2O_2 với nồng độ thấp < 2% (w/v) để oxi hóa cắt mạch chitosan ở dạng dị thể (bột hoặc vảy chitosan phân tán trong nước chứa H_2O_2) không làm thay đổi đáng kể độ deacetyl (ĐĐA%), cấu trúc hóa học của đơn phân nhưng làm giảm đáng kể KLPT của chitosan [15, 88, 95].



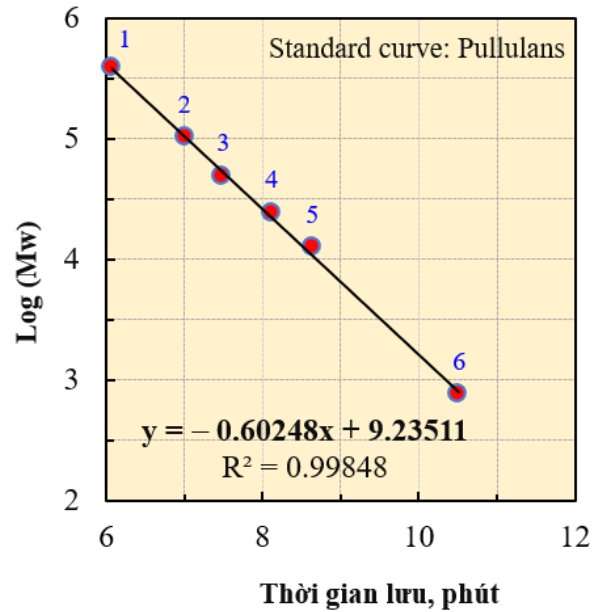
Hình 3.1: Hình dạng vảy chitosan ban đầu (*bên trái*) và chitosan oxi hóa (*bên phải*)

Xuất phát từ nguồn chitosan nguyên liệu sử dụng trong công trình nghiên cứu này, có khối lượng phân tử cao; và kế thừa kết quả từ các công trình nghiên cứu trước đây, trong nội dung công việc này thực hiện xử lý giảm KLPT chitosan bằng phương pháp oxi hóa cắt mạch dị thể với dung dịch 1% H_2O_2 , tỷ lệ 1 g chitosan/10 ml dung dịch H_2O_2 , pH ~10 – 11 được điều chỉnh bằng NaOH, phản ứng thực hiện trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau thời gian phản ứng, lọc lấy bột, rửa với nước và làm khô, thu được bột chitosan có các đặc trưng như sau:

Từ hình ảnh của chitosan ban đầu và chitosan sau xử lý oxi hóa cắt mạch dị thể bằng H_2O_2 như trên [Hình 3.1](#) cho thấy sau quá trình oxi hóa cắt mạch, chitosan thu được dạng vảy mịn có màu vàng sáng so với chitosan ban đầu (màu trắng ngà).

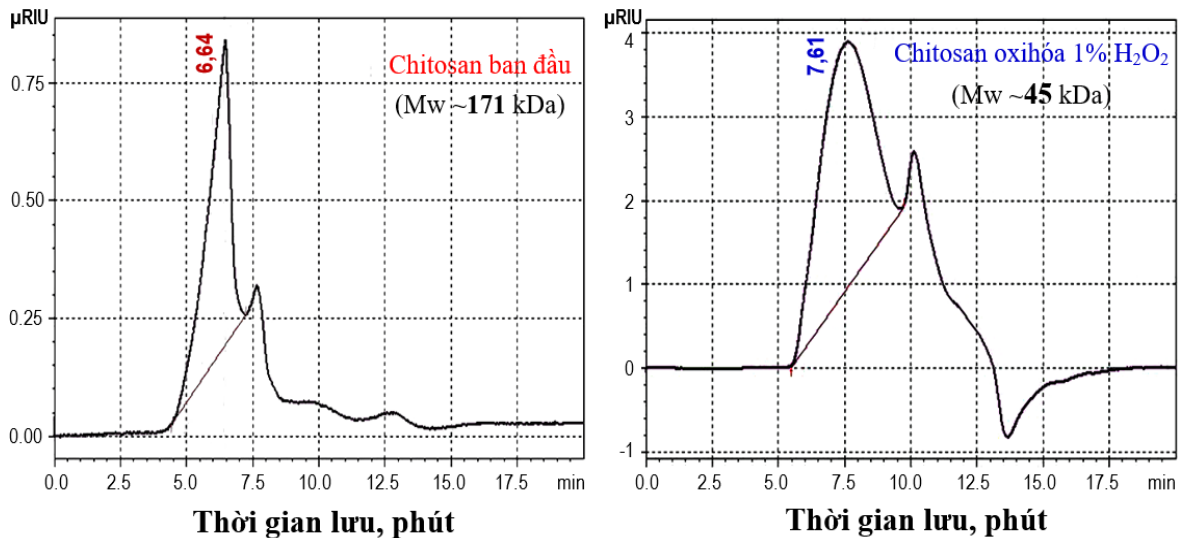
Bảng 3.1: KLPT (Mw), thời gian lưu (t_r) và chỉ số phân tán KLPT (PI) của các chất chuẩn pullulan

STT	Mw, kDa	t_r , phút	PI
1	0,78	6,067	1,00
2	12,20	6,998	1,06
3	23,70	7,499	1,07
4	48,00	8,116	1,09
5	100,00	8,638	1,10
6	380,00	10,518	1,12



Hình 3.2: Đường chuẩn tương quan giữa $\log(M_w)$ với t_r của pullulan

Dựa vào thời gian lưu và diện tích tích phân của đỉnh rửa giải trên phổ GPC của các mẫu chitosan, so với dữ liệu GPC của chất chuẩn pullulan đã được thiết lập (Bảng 3.1, Hình 3.2), để xác định KLPT và độ phân tán KLPT (PI) của chitosan.

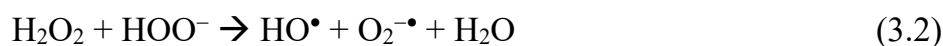


Hình 3.3: Phổ GPC của chitosan ban đầu (bên trái) và chitosan oxi hóa (bên phải)

Kết quả nhận được như mô tả ở Hình 3.3 cho thấy sau quá trình oxi hóa dị thể chitosan trong dung dịch 1% H₂O₂, KLPT của chitosan đã giảm đáng kể từ ~171 kDa (chitosan ban đầu) giảm xuống còn ~45 kDa (chitosan oxi hóa) tương ứng với mức độ giảm ~73,8%. Kết quả về mức độ giảm KLPT này là cao hơn so với kết quả của Thuy và cộng sự (2017) [85], giảm từ 103 kDa xuống còn 45 kDa, tương đương giảm

~55,8%. Sự khác biệt này có thể giải thích là do khác nhau về KLPT chitosan ban đầu và pH của môi trường phản ứng. Như đã biết, H₂O₂ là chất oxi hóa mạnh nhưng thân thiện môi trường [26], có giá trị pKa ~11,6 [31]. H₂O₂ không ổn định và dễ phân ly tạo gốc tự do oxi hóa mạnh trong môi trường kiềm hơn so với môi trường axit. Các gốc tự do oxi hóa (chủ yếu là hydroxyl •OH) tấn công và tách lấy hydro trong các liên kết carbon-hydro, tạo các gốc tự do đại phân tử (R•) và trải qua các quá trình chuyển vị, tái sắp xếp dẫn đến cắt liên kết glycoside trên chuỗi polymer để hình thành các chuỗi polymer có KLPT nhỏ hơn. Đối với trường hợp oxi hóa cắt mạch chitosan dị thể, phản ứng cắt mạch được cho là diễn ra từ ngoài vào trong và ưu tiên ở các vùng vô định hình của chitosan [15, 31].

Cơ chế phân ly và oxi hóa cắt mạch chitosan bằng H₂O₂ được trình bày tóm tắt như sau [9, 15]:

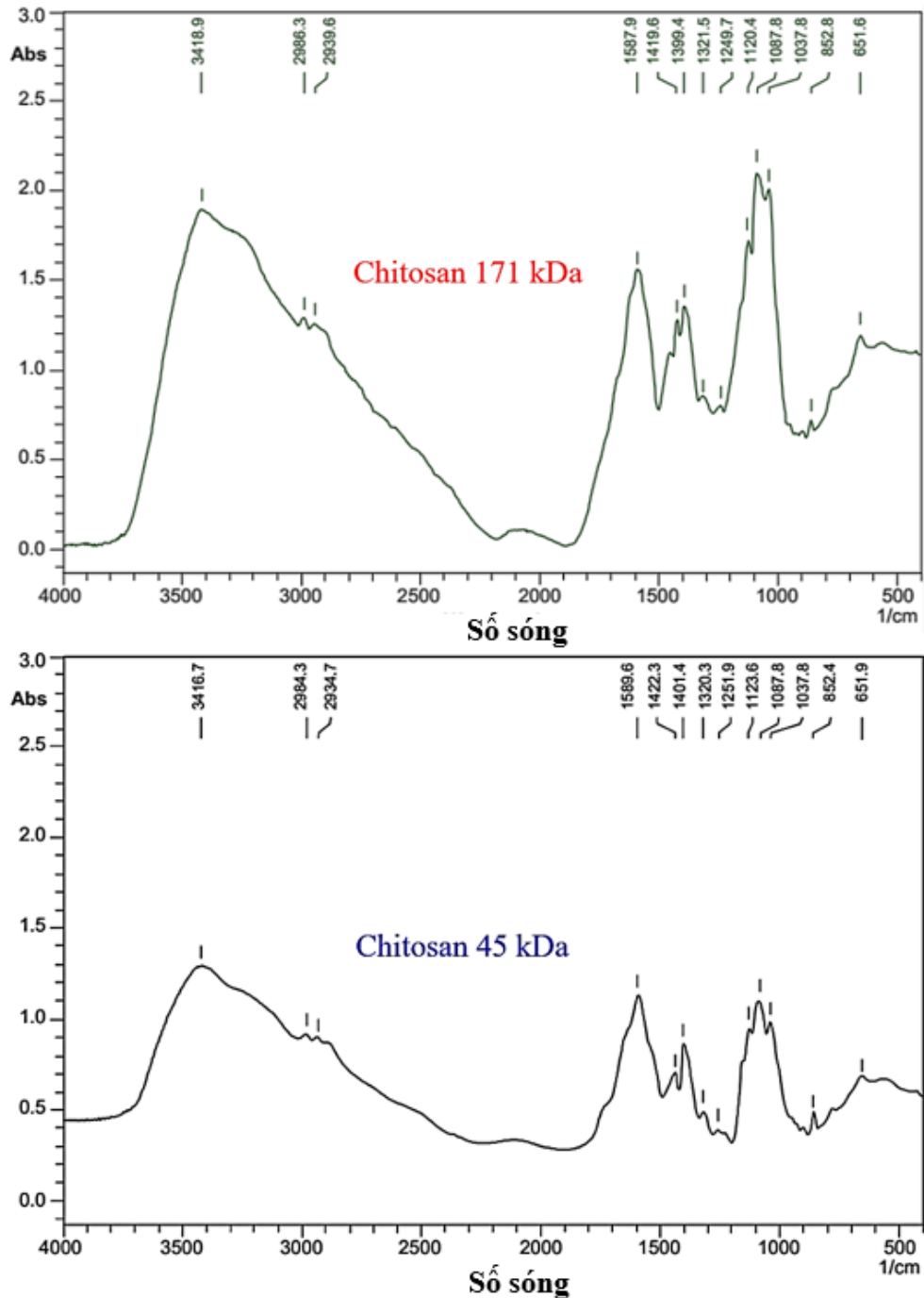


Chuỗi phân tử HO-R₂ và gốc tự do đại phân tử R₁•-OH tiếp tục bị oxi hoá cắt mạch tạo chitosan có KLPT thấp hơn.

Thêm vào đó, theo kết quả đo phổ sắc ký gel thẩm qua (GPC) của các mẫu chitosan ở Hình 3.3 cũng cho thấy chỉ số đa phân tán KLPT $PI = M_w/M_n$ của chitosan oxi hóa là ~2,78 so với của chitosan ban đầu là ~3,26, có nghĩa rằng chitosan sau khi oxi hóa cắt mạch có phân bố KLPT đồng đều hơn. Xu hướng giảm PI của chitosan cắt mạch cũng được công trình khác công bố [31].

Tuy nhiên, kết quả của *Thuy và cộng sự* (2017) [85] thì ngược lại, cụ thể $PI = 1,71$ và $PI = 3,37$ tương ứng đối với chitosan ban đầu và chitosan oxi hóa cắt mạch dị thể với 1% H₂O₂. Nguyên nhân của sự khác biệt này vẫn chưa được rõ, nhưng điều này có thể suy đoán là do sự khác nhau về giá trị PI ban đầu và về kích thước hạt của vẩy bột chitosan dẫn đến khác nhau xác suất và mức độ tương tác giữa tác nhân H₂O₂ với chuỗi phân tử chitosan.

Từ các kết quả trên, nhận thấy rằng H₂O₂ là tác nhân oxi hóa cắt mạch giảm KLPT chitosan hiệu quả. Tuy nhiên, khi dùng nồng độ H₂O₂ cao (>2%) thì quá trình cắt mạch chitosan thường kèm theo phản ứng deamin (mất nhóm -NH₂) và có thể mở vòng glucopyranose làm thay đổi cấu trúc hóa học của phân tử chitosan [15, 31].



Hình 3.4: Phổ FTIR của chitosan ban đầu ~171 kDa và chitosan oxi hóa ~45 kDa

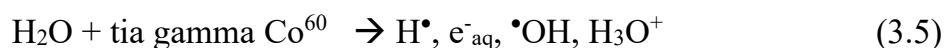
Sự thay đổi cấu trúc phân tử chitosan thường được phân tích dựa trên phổ FTIR. So sánh kết quả phổ FTIR của các mẫu chitosan như trên Hình 3.4 cho thấy, các đỉnh hấp thụ đặc trưng của chitosan gần như không thay đổi đối với chitosan sau oxi hóa cắt mạch với 1% H₂O₂, đặc biệt không xuất hiện đỉnh ~1735 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động của nhóm -COOH [31], chứng tỏ sản phẩm chitosan cắt mạch không bị oxi hóa mở vòng glucopyranose. Ngoài ra, kết quả xác định ĐĐA của các mẫu đạt được là 91,72% và 91,11% tương ứng đối với chitosan ban đầu và chitosan oxi hóa, chứng tỏ ở điều kiện phản ứng này hầu như không xảy ra phản ứng deamin.

Kết quả nhận được từ công trình này cũng phù hợp như kết quả của *Qin và cộng sự* (2002) khi thực hiện nghiên cứu cắt mạch dị thể chitosan với KLPT ban đầu 498 kDa bằng 1% H₂O₂ ở nhiệt độ 60°C thu được chitosan 50 kDa với cấu trúc hóa học của chitosan gần như không thay đổi. Nhóm tác giả này đã kết luận rằng chitosan oxi hóa cắt mạch dị thể có KLPT >51 kDa thì không bị thay đổi cấu trúc hóa học, ngược lại những chitosan cắt mạch đến KLPT 1,2 – 3,5 kDa thì bị deamin từ 15% đến 40% và bị mở vòng tạo sản phẩm carboxyl từ 1,71 đến 2,86 mmol/g [31].

Như vậy, nội dung xử lý điều chỉnh giảm KLPT của chitosan bằng phương pháp oxi hóa cắt mạch dị thể đã được thực hiện thành công, sản phẩm thu được là chitosan có KLPT ~45 kDa, PI ~2,78 và ĐĐA ~91,1% được sử dụng làm nguyên liệu để thực hiện các nội dung nghiên cứu tiếp theo.

3.1.2. Cắt mạch đồng thể bằng bức xạ gamma Co⁶⁰ kết hợp H₂O₂ chế tạo oligochitosan

Bức xạ tia gamma Co⁶⁰ được đánh giá là một trong những phương pháp hữu hiệu để cắt mạch chitosan ở cả trạng thái rắn, trạng thái trương nước và trạng thái hòa tan trong dung dịch. Trong đó, mức độ cắt mạch chitosan trong dung dịch thì cao hơn đáng kể so với trạng thái chitosan rắn. Điều này là do tương tác của các gốc tự do hydroxyl (•OH) có tính oxi hóa mạnh được hình thành trong quá trình xạ ly nước. Các gốc tự do •OH tấn công các liên kết 1-4 glycoside dẫn đến cắt nhỏ chuỗi phân tử chitosan [89]. Hơn thế nữa, khi xử lý kết hợp giữa bức xạ gamma Co⁶⁰ với H₂O₂ đã làm gia tăng hiệu quả cắt mạch chitosan trong dung dịch [88]. Nguyên nhân của sự gia tăng mức độ cắt mạch đã được lý giải là do hiệu ứng đồng vận (synergistic effect) giữa bức xạ gamma Co⁶⁰ và H₂O₂ trong dung dịch chitosan. Dưới điều kiện chiếu xạ tia gamma Co⁶⁰, ngoài sản phẩm gốc tự do •OH từ xạ ly nước còn có gốc tự do •OH từ xạ ly H₂O₂ cùng tham gia phản ứng cắt mạch chitosan như được sau [26, 27]:



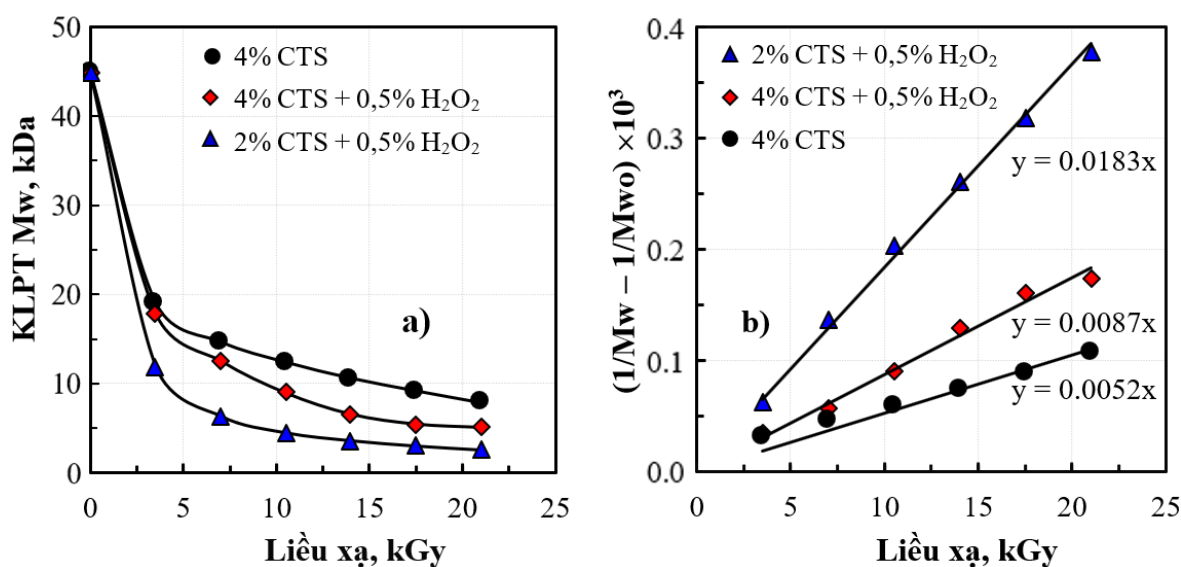
Và tương tác của H₂O₂ với H[•], e⁻_{aq}:



Do vậy có thể thấy lượng •OH sinh ra trong hệ gia tăng, mà •OH là một tác nhân oxi hóa mạnh gây cắt mạch chitosan thông qua phản ứng tách lấy các nguyên

tử hydro trong liên kết C–H với hằng số phản ứng $k > 10^9$ l/mol/giây, kết quả tạo các gốc tự do đại phân tử chitosan (R^\bullet). Tiếp đến là quá trình chuyển vị và tái sắp xếp các gốc R^\bullet để hình thành các chuỗi chitosan có KLPT thấp hơn chitosan ban đầu [28].

Mặc dù, cắt mạch chitosan ở trạng thái dung dịch bằng phương pháp kết hợp giữa bức xạ gamma Co^{60} với H_2O_2 được đánh giá là hiệu quả, đặc biệt xem xét về góc độ tác động môi trường và tiết kiệm năng lượng [131]. Tuy nhiên, một trong những thách thức của phương pháp này là thiết lập được điều kiện phản ứng cắt mạch dung dịch chitosan phù hợp để tạo được oligochitosan (OC) có KLPT thấp < 10 kDa, đặc biệt là tạo loại OC với KLPT trong khoảng nhỏ hơn 5 kDa, mà tối thiểu sự thay đổi cấu trúc hóa học của phân tử chitosan (độ deacetyl, mở vòng glucoside) [26, 29]. Để kiểm soát chất lượng sản phẩm OC cắt mạch bức xạ gamma Co^{60} kết hợp với H_2O_2 , thông thường điều chỉnh các yếu tố chủ yếu sau: liều xạ, nồng độ H_2O_2 , nồng độ và đặc trưng KLPT, độ deacetyl của chitosan ban đầu.



Hình 3.5: KLPT của chitosan theo liều xạ (a) và mối liên hệ giữa $(1/Mw - 1/Mwo)$ theo liều xạ của các mẫu chitosan cắt mạch trong điều kiện khác nhau (b)

Cùng với mục đích khắc phục thách thức trên, đồng thời hướng đến chế tạo các loại OC có KLPT < 10 kDa để đánh giá hiệu ứng sinh học, trong nội dung nghiên cứu này thực hiện cắt mạch dung dịch chitosan (đặc trưng ban đầu như đã mô tả ở nội dung 3.1.1) trong 03 điều kiện khác nhau. Cụ thể là chiếu xạ tia gamma Co^{60} theo liều xạ khác nhau đối với 03 hỗn hợp dung dịch: 01) dung dịch chitosan 4%/trong axit lactic 2% (4% CTS); 02) dung dịch chitosan 4%/trong axit lactic 2% + 0,5% H_2O_2 (4% CTS + 0,5% H_2O_2); và 03) dung dịch chitosan 2%/trong axit lactic 1% + 0,5% H_2O_2 (2% CTS + 0,5% H_2O_2). Kết quả mức độ giảm KLPT chitosan theo liều xạ từ các điều kiện cắt mạch khác nhau được trình bày trên [Hình 3.5](#).

Từ kết quả sự thay đổi KLPT của chitosan theo liều xạ ở [Hình 3.5a](#) cho thấy KLPT của chitosan ở 03 điều kiện cắt mạch đều giảm theo hướng tăng liều xạ xử lý. Trong đó, ở khoảng liều xạ xử lý nhỏ hơn 10,5 kGy thì mức độ giảm KLPT chitosan diễn ra nhanh. Cụ thể tại liều xạ 10,5 kGy, KLPT chitosan ban đầu ~45 kDa đã giảm xuống còn 12,3 kDa; 9,0 kDa; và 4,4 kDa tương ứng đối với các dung dịch cắt mạch 4% CTS; 4% CTS + 0,5% H₂O₂; và 2% CTS + 0,5% H₂O₂.

Trong khi đó, trong khoảng liều xạ xử lý lớn hơn 10,5 kGy thì mức độ giảm KLPT chitosan tiếp theo diễn ra chậm lại. Cụ thể tại liều xạ 21 kGy, KLPT của các mẫu chitosan tại liều xạ 10,5 kGy chỉ giảm xuống còn 7,8 kDa; 5,1 kDa; và 2,5 kDa tương ứng đối với các dung dịch cắt mạch 4% CTS; 4% CTS + 0,5% H₂O₂; và 2% CTS + 0,5% H₂O₂. Hiện tượng này cũng đã được ghi nhận trong các nghiên cứu khác khi cắt mạch dung dịch chitosan bằng bức xạ [[27](#), [29](#), [89](#), [132](#), [133](#)]. Theo đó KLPT của chitosan giảm mạnh ở giai đoạn đầu của quá trình chiếu xạ, sau đó mức độ cắt mạch giảm chậm dần khi tăng liều xạ.

Nguyên nhân của hiện tượng này cho đến nay vẫn tiếp tục nghiên cứu làm rõ. Tuy nhiên, đã có những lập luận về vấn đề này dựa trên những cơ sở sau: i) Góc tự do •OH ưu tiên tấn công cắt mạch chuỗi phân tử chitosan có độ linh động thấp, dẫn đến khi cắt mạch đến một mức độ nào đó thì tốc độ cắt mạch chậm lại. Nguyên nhân có thể là do khi chuỗi mạch chitosan càng ngắn thì độ linh động càng cao, sự tương tác của gốc tự do •OH lên mạch chitosan giảm, đồng thời phản ứng tái kết hợp giữa gốc tự do •OH với H• tạo thành nước sẽ cạnh tranh với phản ứng cắt mạch chitosan nên mức độ cắt mạch giảm so với giai đoạn đầu [[133](#)]; ii) Quá trình cắt mạch sâu có thể gây mất nhóm amin làm ảnh hưởng đến mức độ tương tác với gốc tự do •OH dẫn đến hạn chế cắt mạch [[88](#)]; và iii) Khi tiếp tục gia tăng tác nhân và kéo dài phản ứng cắt mạch sẽ tăng mật độ phân tử chitosan (tổng nồng độ chitosan không đổi nhưng tăng số lượng phân tử chitosan) và gia tăng tính linh động của gốc tự do đại phân tử (do KLPT thấp) dẫn đến tăng xác suất tái kết hợp giữa các gốc tự do đại phân tử, điều này làm giảm mức độ cắt mạch [[31](#), [88](#), [95](#)].

Kết quả trong [Hình 3.5a](#) cũng chỉ ra rằng KLPT của chitosan từ dung dịch 4% CTS + 0,5% H₂O₂ được chiếu xạ thấp hơn so với dung dịch 4% CTS được chiếu xạ mà không chứa H₂O₂, cụ thể KLPT (Mw) đạt được tương ứng là 5,1 kDa và 7,8 kDa tại liều xạ 21 kGy. Kết quả này chứng tỏ rằng cắt mạch chitosan trong dung dịch bằng phương pháp kết hợp chiếu xạ gamma Co⁶⁰ với H₂O₂ có hiệu quả cao hơn, do hiệu ứng đồng vận xúc tiến gia tăng mức độ phản ứng, kết quả làm giảm KLPT của chitosan hiệu quả hơn so với cắt mạch chỉ bằng bức xạ [[26](#), [27](#), [89](#)].

Đối với sự cắt mạch chitosan bằng bức xạ thì mức độ cắt mạch được ghi nhận là phụ thuộc vào độ deacetyl [134], KLPT ban đầu [29], và nồng độ chitosan trong dung dịch [27]. Kết quả Hình 3.5a cũng thấy rằng KLPT OC có sự phụ thuộc nồng độ chitosan ban đầu, nồng độ càng cao thì OC có KLPT lớn hơn so với mẫu có nồng độ thấp. Cụ thể tại liều xạ 21 kGy, KLPT của OC là 2,5 kDa đối với mẫu 2% CTS + 0,5% H₂O₂ so với 5,1 kDa của mẫu 4% CTS + 0,5% H₂O₂.

Kết quả nhận được tương tự như các công bố trước đây [26, 100]. Nguyên nhân được cho là trong dung dịch chitosan có nồng độ thấp thì tỷ lệ nồng độ gốc •OH so với số phân tử chitosan cao hơn so với dung dịch chitosan nồng độ cao, dẫn đến mức độ cắt mạch cao hơn [100, 134]. El-Sawy và cộng sự (2010) nghiên cứu cắt mạch chitosan bằng cách trộn bột chitosan với H₂O₂ tạo dạng bột nhão (paste). Sau đó mẫu này được chiếu xạ với liều từ 20 đến 200 kGy. Dựa trên kết quả mức độ giảm KLPT, tác giả biện luận rằng tính linh động của gốc tự do •OH trong dung dịch huyền phù (suspension) thì cao hơn so với trong dạng bột nhão. Kết quả là hiệu ứng cắt mạch đồng vận trong dung dịch chitosan có nồng độ thấp thì hiệu quả cao hơn so với dung dịch chitosan nồng độ cao [75].

Từ phương trình mối liên hệ giữa $(1/M_w - 1/M_{w0})$ theo liều xạ của các mẫu chitosan cắt mạch trong điều kiện khác nhau như mô tả trên Hình 3.5b, các giá trị hiệu suất cắt mạch bức xạ (Gs) xác định được là 0,4 $\mu\text{mol/J}$; 0,67 $\mu\text{mol/J}$; và 0,72 $\mu\text{mol/J}$ tương ứng đối với dung dịch chitosan 4% CTS; 4% CTS + 0,5% H₂O₂; và 2% CTS + 0,5% H₂O₂. Kết quả giá trị Gs nhận được trong nghiên cứu này là cao hơn so với công trình của Wasikiewicz và cộng sự (2005) (đạt 0,35 $\mu\text{mol/J}$ khi chiếu xạ dung dịch 1% chitosan) [134] và cao hơn kết quả của Duy và cộng sự (2011) (đạt ~0,53 $\mu\text{mol/J}$ khi chiếu xạ 20 kGy dung dịch 3% CTS + 0,5 H₂O₂) [27]. Nguyên do có thể là sự khác nhau về KLPT chitosan ban đầu. Chitosan sử dụng trong công trình của Wasikiewicz và cộng sự (2005) [134] là ~400 kDa và 110 kDa trong công trình của Duy và cộng sự (2011) [27] so với ~45 kDa trong nghiên cứu này. Do vậy, có thể nhận xét rằng phương pháp cắt mạch kết hợp chiếu xạ với H₂O₂ đối với dung dịch chitosan có KLPT ban đầu thấp thì hiệu quả sử dụng năng lượng bức xạ sẽ cao hơn.

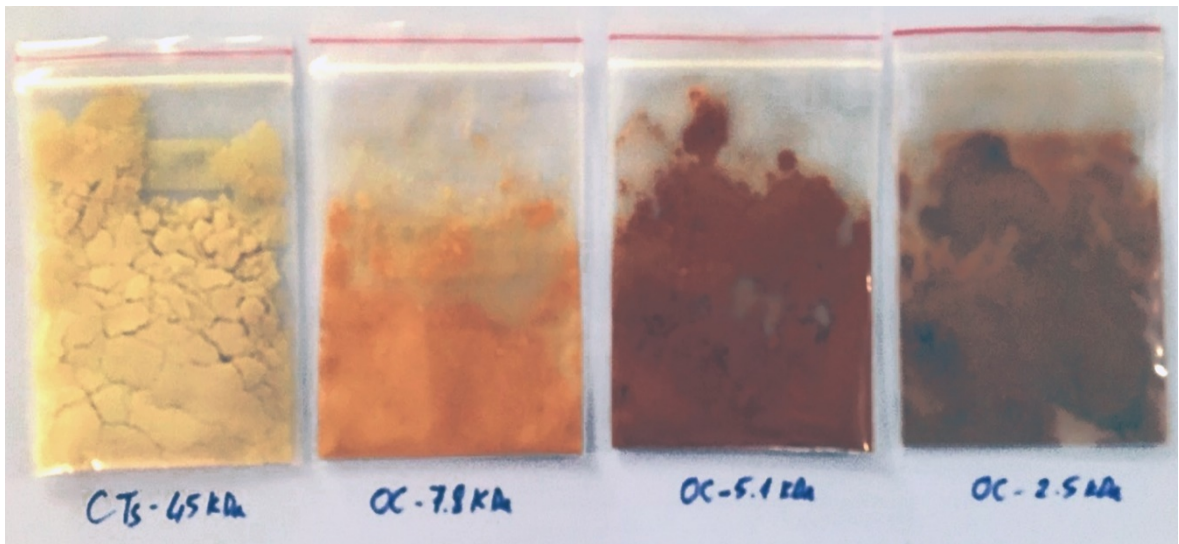
Theo Das và cộng sự (2015), thách thức lớn nhất trong việc áp dụng OC để bảo vệ thực vật nằm ở việc phát triển các phương pháp hiệu quả để sản xuất OC quy mô lớn [135]. Như vậy, phương pháp cắt mạch dung dịch chitosan bằng chiếu xạ tia gamma Co⁶⁰ kết hợp H₂O₂ có thể áp dụng trong sản xuất quy mô lớn các oligosaccharide trong đó có OC.

Nhằm để phục vụ cho nội dung nghiên cứu hiệu ứng sinh học của phức

oligochitosan-Zn²⁺ được tạo từ OC có KLPT khác nhau. Trong công trình nghiên cứu này lựa chọn 03 loại OC có KLPT lần lượt là 7,8 kDa; 5,1 kDa; và 2,5 kDa được chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ trong các điều kiện khác nhau [32] với các đặc trưng tính chất cụ thể như sau:



Hình 3.6: Màu sắc của các dung dịch chitosan cắt mạch có KLPT khác nhau
 Từ trái qua phải lần lượt là: Chitosan 45 kDa, OC 7,8 kDa; OC 5,1 kDa; và OC 2,5 kDa.



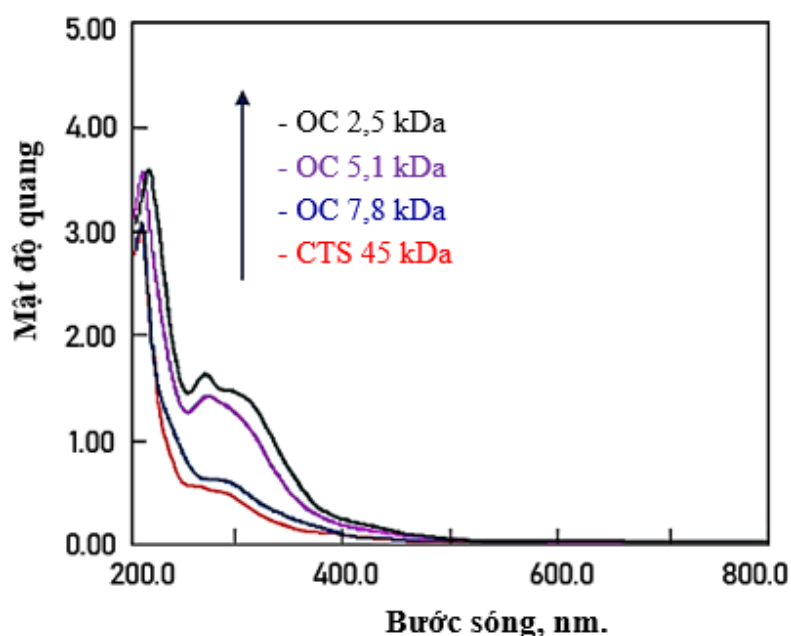
Hình 3.7: Màu sắc bột sau rửa – làm khô của chitosan 45 kDa và oligochitosan có KLPT khác nhau

Từ trái qua phải lần lượt là: Chitosan 45 kDa, OC 7,8 kDa; OC 5,1 kDa; và OC 2,5 kDa.

Màu sắc của các dung dịch OC và dạng bột đều có sự thay đổi so với chitosan ban đầu (Hình 3.6 và Hình 3.7). Chuyển từ màu vàng nhạt (chitosan ban đầu) sang màu nâu nhạt cho đến nâu sẫm theo chiều giảm KLPT của OC. Sự thay đổi màu của

các OC có thể là do trong quá trình cắt mạch sâu hình thành các sản phẩm phụ bất màu như ion oxazolinium [136], sản phẩm hóa nâu của phản ứng Maillard [137] và các dạng glucoside mở vòng [138].

Hiện tượng thay đổi màu của chitosan cắt mạch cũng được quan sát trên phổ UV-Vis liên quan đến các thay đổi hóa học của phân tử chitosan sau cắt mạch. Sự thay đổi màu được cho là kết quả hình thành cấu trúc vòng glucopyranose chưa bão hòa (chứa nhóm carbonyl hay nhóm carboxyl) và sản phẩm trung gian vòng ion carbonium khi các gốc tự do tái kết hợp với nhau [97]. Ngoài ra, cũng có giả thuyết cho rằng sự thay đổi màu sắc của chitosan cắt mạch còn do sự hình thành liên kết đôi N=C từ phản ứng Maillard giữa nhóm $-CHO$ (nhóm cuối của 2,5-anhydro-D-mannose) và nhóm $-NH_2$ của chitosan [28].



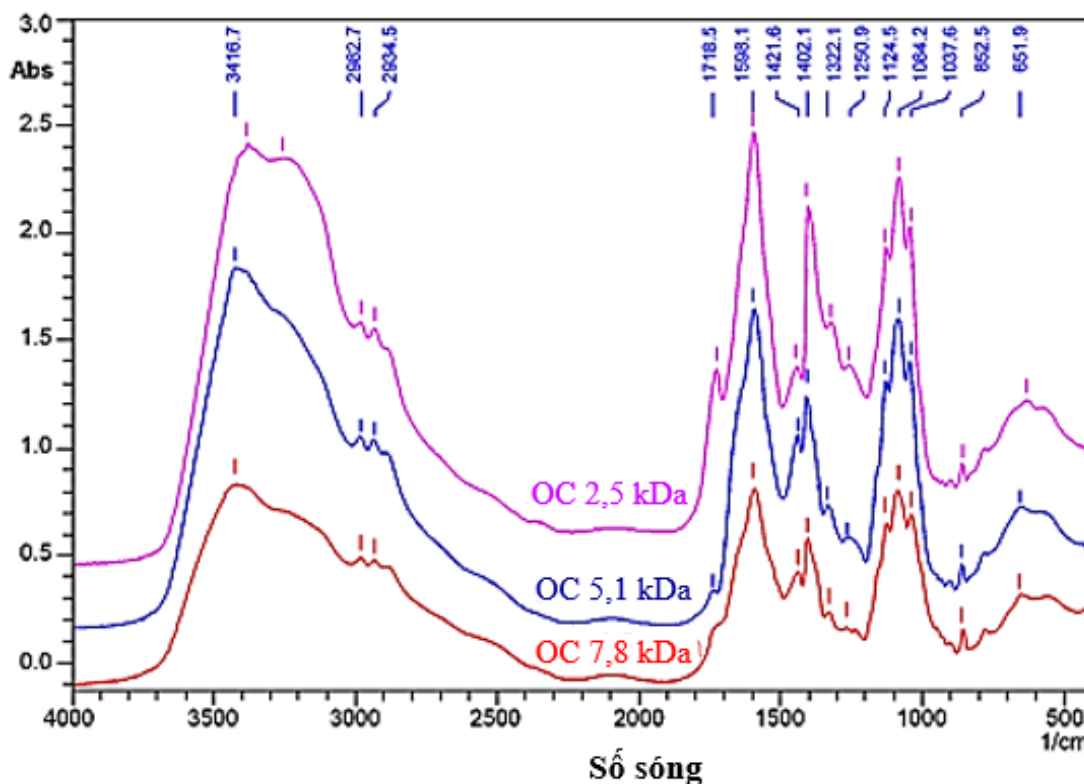
Hình 3.8: Phổ UV-Vis của chitosan 45 kDa và oligochitosan có KLPT khác nhau

Kết quả đo phổ UV-Vis của các dung dịch chitosan và OC với KLPT khác nhau như trình bày trên Hình 3.8. Đối với dung dịch chitosan 45 kDa ban đầu, chỉ có 01 đỉnh hấp thụ trong vùng ~ 206 nm, đỉnh này được cho là do trạng thái chuyển dịch điện tử trung gian trong liên kết $n \rightarrow \sigma^*$ của nhóm amido trên phân tử chitosan [42]. Trong khi, trên phổ UV-Vis của các OC cắt mạch bức xạ xuất hiện thêm các đỉnh mới trong vùng 265 – 281 nm với cường độ tăng dần theo chiều giảm KLPT của OC, nghĩa là chitosan bị cắt mạch bức xạ càng sâu thì cường độ của các đỉnh hấp thụ tại các bước sóng này càng tăng.

Đỉnh hấp thụ trong khoảng bước sóng 240 – 265 nm là sự chuyển dời đỉnh hấp thụ đặc trưng của điện tử trung gian trong liên kết $n \rightarrow \sigma^*$ nhóm amido [42], và cũng

là đỉnh hấp thụ đặc trưng của liên kết C=O của nhóm carboxyl [139]. Đỉnh trong vùng giữa 270 – 300 nm được cho là hấp thụ đặc trưng của nhóm carbonyl trên các đơn vị glucoside cuối mạch phân tử chitosan sau cắt mạch [29].

Sự gia tăng cường độ của các đỉnh hấp thụ trên, có thể xác nhận là kết quả hình thành liên kết đôi C=O và mở vòng glucoside trong quá trình phản ứng cắt mạch và phản ứng tách lấy hydrogen [89]. Từ những lập luận trên và kết quả Hình 3.8 có thể nhận định mẫu OC 5,1 kDa và OC 2,5 kDa chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ 21 kGy các dung dịch tương ứng là 4% CTS + 0,5% H₂O₂ và 2% CTS + 0,5% H₂O₂, có sự thay đổi cấu trúc hóa học nhiều hơn so với OC 7,8 kDa. Để làm rõ hơn sự thay đổi này, tiếp tục phân tích kết quả đo phổ FTIR của các mẫu OC có KLPT khác nhau được tạo ra trong các điều kiện cắt mạch khác nhau.



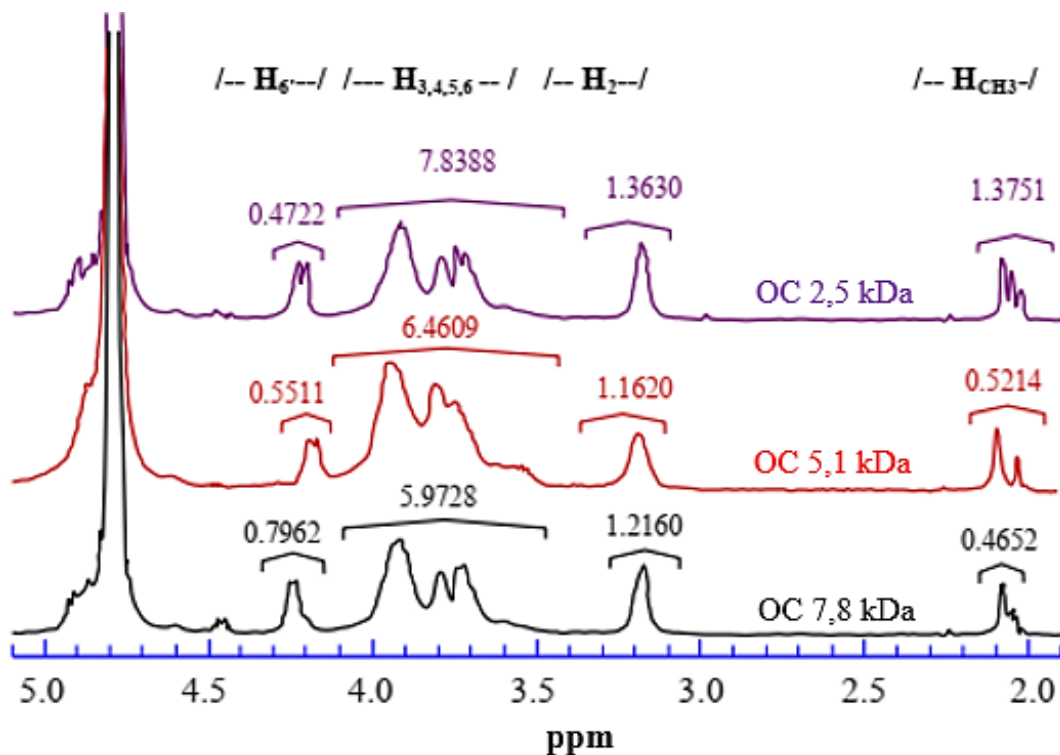
Hình 3.9: Phổ FTIR của oligochitosan có KLPT khác nhau

Phổ FTIR được xem là công cụ hữu ích để phân tích các đặc trưng hóa lý của polysaccharide. Kết quả phổ đồ FTIR và cường độ dao động liên kết hóa học của các OC cắt mạch bức xạ có KLPT 7,8 kDa; 5,1 kDa; và 2,5 kDa được trình bày trên Hình 3.9. Các đỉnh hấp thụ FTIR đặc trưng của chitosan: ở 3200 – 3420 cm⁻¹ (dao động căng của liên kết O–H và N–H); 2850 – 2900 cm⁻¹ (dao động căng của C–H); 1598 cm⁻¹ (đặc trưng của –NH₂); 1421 cm⁻¹ (dao động biến dạng đối xứng của –CH₂ và –CH₃); 1322 cm⁻¹ (dao động của amid III (C–N) trong –NHCOCH₃); 1251 cm⁻¹ (dao động xoắn

của O–H); và $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ được cho dao động căng của liên kết C–O–C [15, 89, 136], đều xuất hiện trong phổ FTIR của các OC. Điều này chứng tỏ rằng cấu trúc hóa học (nhóm chức) chính của chitosan gần như được duy trì trên các phân tử OC.

Tuy nhiên, trên phổ FTIR của các OC, đỉnh đặc trưng cho dao động của liên kết O–H và N–H có xu hướng dịch chuyển về số sóng thấp hơn; cường độ đỉnh 775 cm^{-1} , đỉnh dao động đặc trưng của liên kết N=C trong nhóm $\text{N}=\text{CHCOO}^-$ của sản phẩm Maillard [15] tăng lên trong các mẫu OC KLPT thấp; đồng thời có xuất hiện đỉnh hấp thụ mới tại 1718 cm^{-1} với cường độ tăng dần lần lượt trong các mẫu OC 7,8 kDa, 5,1 kDa và 2,5 kDa, đỉnh này được cho là dao động đặc trưng của nhóm carboxyl [31, 139]. Hơn nữa, cường độ dao động của $-\text{NH}_2$ cũng giảm theo chiều giảm KLPT OC (đỉnh kèm ở phần phụ lục), kết quả cũng tương tự như công bố của Mahmud và cộng sự (2014) [88].

Từ những thông tin thay đổi trên phổ FTIR của OC nhận được bằng phương pháp chiếu xạ cắt mạch trong các điều kiện khác nhau, có thể kết luận rằng trong quá trình cắt mạch thì ngoài phản ứng chính là cắt các liên kết glycoside của chuỗi phân tử chitosan còn có xuất hiện phản ứng mở vòng glucoside và hủy nhóm amin với mức độ khác nhau tùy thuộc vào điều kiện chiếu xạ. Mức độ hủy nhóm amin được xác định cụ thể hơn từ kết quả đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân ($^1\text{H NMR}$).



Hình 3.10: Phổ $^1\text{H NMR}$ của oligochitosan có KLPT khác nhau

Cho đến nay, xác định độ deacetyl (ĐĐA%) hay hàm lượng phần trăm của D-

glucosamine trong phân tử chitosan, OC bằng phổ ^1H NMR được đánh giá có độ chính xác cao và đã được sử dụng rộng rãi [105-107]. Trong phương pháp ^1H NMR, không cần biết chính xác lượng chitosan hay OC sử dụng. Hơn nữa, việc chuẩn bị mẫu đơn giản, chỉ cần vài miligam mẫu và không cần bất kỳ đường chuẩn hoặc mẫu tham chiếu nào có ĐĐA đã biết. Các đỉnh cộng hưởng proton được sử dụng để xác định ĐĐA trong phương pháp này có độ phân giải tốt và việc lấy diện tích tích phân các đỉnh này đơn giản. Phương pháp ^1H NMR đã được chứng minh là có khả năng xác định chính xác ĐĐA thậm chí đối với các mẫu có ĐĐA thấp, mà thường khó đo bằng các kỹ thuật thông thường như FTIR hoặc chuẩn độ.

Các tín hiệu cộng hưởng proton của OC có KLPT khác nhau như được trình bày trên Hình 3.10. Tín hiệu cộng hưởng đặc trưng của chitosan tại 2,02 – 2,10 ppm tương ứng với cộng hưởng của các proton thuộc nhóm acetyl trên các đơn vị N-acetyl-D-glucosamine [136], các tín hiệu trong vùng 3,30 – 4,30 ppm là đặc trưng của các proton H3, H4, H5, H6 và H6' [140], tín hiệu tại ~3,20 ppm là đặc trưng proton H2 của đơn vị D-glucosamine [107] và tín hiệu tại 4,75 – 4,90 ppm là của proton dung môi và H1 của đồng phân β -anomer [107, 140]. Tất cả các tín hiệu cộng hưởng proton đặc trưng của chitosan đều xuất hiện trong phổ ^1H NMR của các OC chế tạo được nhưng khác nhau diện tích tích phân cường độ của các đỉnh cộng hưởng. Điều này phản ánh sự khác nhau về giá trị ĐĐA% của các OC. Từ diện tích tích phân cường độ của các đỉnh cộng hưởng tính toán được giá trị ĐĐA của các mẫu OC như được trình bày cụ thể trong Bảng 3.2.

Bảng 3.2: Diện tích tích phân cường độ (I) của các proton và kết quả độ deacetyl (ĐĐA) của các oligochitosan có KLPT khác nhau

Mẫu oligochitosan	I, H _{3,4,5,6,6'}	I, H ₂	ĐĐA, %
OC 7,8 kDa	6,769	1,363	88,35
OC 5,1 kDa	7,012	1,162	87,24
OC 2,5 kDa	8,311	1,216	71,57

Kết quả về ĐĐA của OC nhận được bằng phương pháp chiếu xạ cắt mạch đồng thể như trên Bảng 3.2 cho thấy rằng, các OC đạt KLPT thấp, nghĩa là bị cắt mạch sâu thì có xu hướng giảm ĐĐA. Cụ thể là giá trị ĐĐA đạt lần lượt là ~88,4%; 87,2%; và 71,6% tương ứng đối với OC có KLPT là 7,8 kDa; 5,1 kDa; và 2,5 kDa. So với giá trị ĐĐA ~91% của chitosan ban đầu KLPT ~45 kDa thì các mẫu OC > 5 kDa gần như không giảm ĐĐA đáng kể, trong khi đó mẫu OC 2,5 kDa có giá trị ĐĐA thấp hơn ~21% so với chitosan ban đầu. Sự suy giảm ĐĐA của OC khi bị cắt mạch

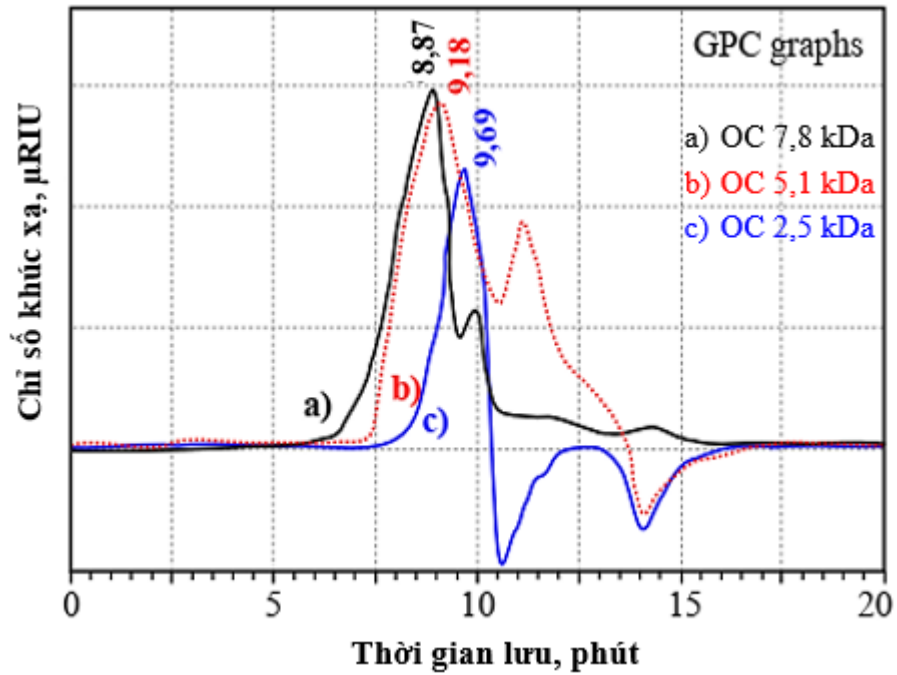
sâu cũng phù hợp với thông tin phổ FTIR. Hiện tượng tương tự cũng đã được ghi nhận trong các nghiên cứu trước đây [26, 27].

Kết quả trong công trình của [Duy và cộng sự](#) (2011) cho thấy ĐĐA% của OC giảm từ 84% (chitosan ban đầu 110 kDa) xuống còn 77,5 – 74,4% đối với OC cắt mạch bức xạ đạt KLPT từ 9,3 kDa đến 5,1 kDa [27]. Trong công trình nghiên cứu của [Mahmud và cộng sự](#) (2014) cũng cho thấy ĐĐA ~97% của chitosan ban đầu với KLPT 173 kDa giảm xuống còn ~78% đối với OC 7,9 kDa thu được sau cắt mạch bằng bức xạ kết hợp H₂O₂ [88]. Giá trị ĐĐA thấp của các OC chứng tỏ rằng, trong điều kiện cắt mạch sâu sẽ xuất hiện phản ứng không mong muốn đó là phản ứng khử nhóm amin của chitosan. Ngoài ra, theo kết quả nghiên cứu của [Chokradjaroen và cộng sự](#) (2017) cắt mạch chitosan bằng phương pháp xử lý plasma kết hợp với H₂O₂ cũng xác nhận có sự giảm ĐĐA của chitosan. Cụ thể là ĐĐA 91,5% của chitosan ban đầu (KLPT ~440 kDa) sau xử lý cắt mạch thu được chitosan KLPT thấp có ĐĐA 87,8%. Tác giả kết luận rằng, quá trình cắt mạch chitosan bằng xử lý plasma + H₂O₂ có thể gây ra sự phân cắt một số nhóm amin của chitosan dẫn đến giảm ĐĐA của chitosan [100]. [Shen và cộng sự](#) (2011) báo cáo rằng ĐĐA của chitosan giảm khi tăng liều xạ và suy luận rằng khi chiếu xạ, một số nhóm –NH₂ của chitosan sẽ bị loại bỏ và chuyển thành khí amoniac sau khi tương tác với các gốc tự do H[•] [101].

Từ các kết quả trên, có thể nhận định rằng sử dụng phương pháp kết hợp tác nhân vật lý (bức xạ gamma Co⁶⁰, plasma) với H₂O₂ để chế tạo OC với KLPT < 5 kDa sẽ gây ảnh hưởng ít nhiều đến ĐĐA của sản phẩm. Vấn đề hạn chế này cần được tiếp tục nghiên cứu cải thiện.

Tuy nhiên, [Vander và cộng sự](#) (1998) thông báo rằng OC với ĐĐA trung gian (70 – 80%) cũng có hiệu ứng phòng trừ bệnh hiệu quả cho cây trồng. OC thu được trong nghiên cứu này vừa kháng nấm *Pyricularia grisea* và vừa kích thích sinh trưởng trên lúa [141]. Kết quả nghiên cứu của [El-Sawy và cộng sự](#) (2010) cũng minh chứng rằng OC chế tạo bằng phương pháp cắt mạch bức xạ có KLPT < 10 kDa và có sự hình thành các nhóm carboxyl và bị loại bỏ một phần các nhóm amin cũng thể hiện hiệu ứng kích thích tăng trưởng và gia năng suất trên cây đậu tằm [75].

Gần đây hơn, [Dzung và cộng sự](#) (2017) đã minh chứng OC KPLT 2,5 kDa được chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co⁶⁰ kết hợp H₂O₂ có hoạt tính kích thích tăng trưởng và kích kháng bệnh hiệu quả trên cây ớt [32]. Theo [Stasińska-Jakubas và cộng sự](#) (2022) đã tổng kết rằng, hiệu ứng sinh học của chitosan phụ thuộc vào nhiều yếu tố nhưng trong số đó thì đặc trưng KLPT có ảnh hưởng quyết định hơn cả đến hoạt tính của chitosan [5].



Hình 3.11: Phổ GPC của oligochitosan có KLPT khác nhau

Hình 3.11 mô tả các đường cong rửa giải GPC của các mẫu OC chiếu xạ cắt mạch đồng thể tại liều xạ 21 kGy trong các điều kiện khác nhau. Kết quả cho thấy rằng các mẫu chitosan cắt mạch càng sâu thì có thời gian lưu càng lớn. Kết quả này tương tự như trường hợp chitosan dạng thanh (rod) cắt mạch bức xạ [101] và alginate cắt mạch bức xạ được công bố bởi El-Mohdy (2017) [142]. Từ kết quả thời gian lưu và diện tích đỉnh rửa giải trên đường cong GPC, xác định được KLPT trung bình khối lượng (Mw), KLPT trung bình số (Mn) và chỉ số đa phân tán KLPT (PI) của chitosan cắt mạch. Đặc trưng KLPT và PI của các OC được trình bày trong Bảng 3.3.

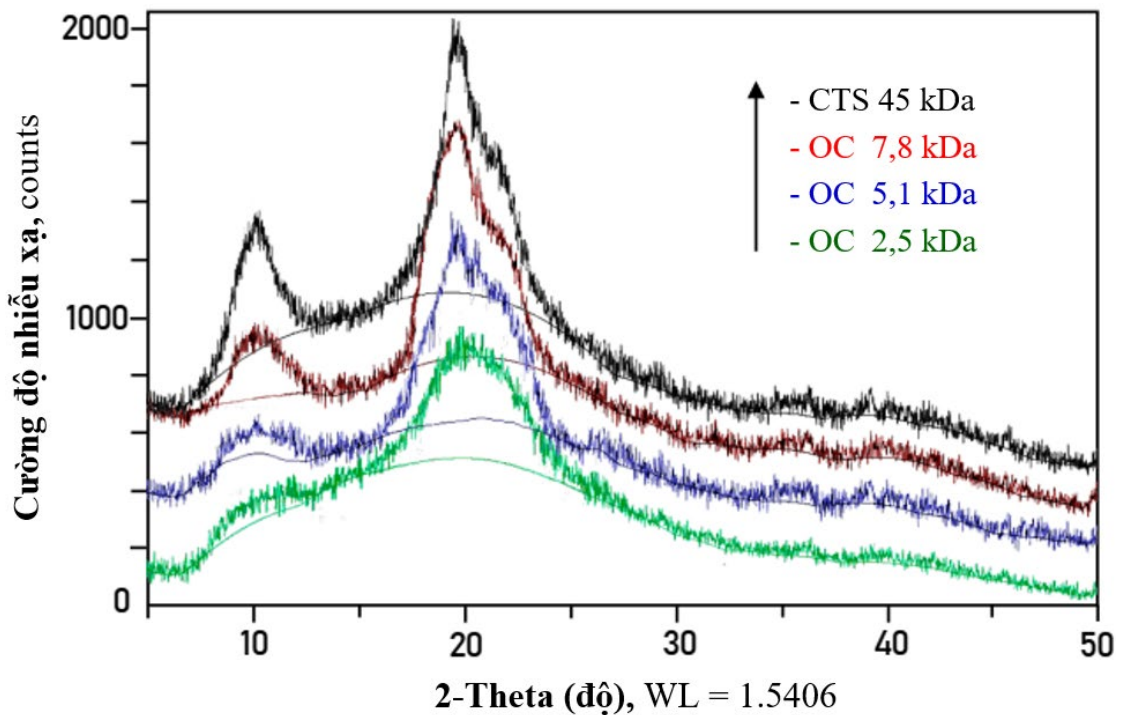
Bảng 3.3: KLPT (Mw, Mn) và chỉ số phân tán KLPT (PI) của các mẫu oligochitosan cắt mạch bức xạ với liều xạ 21 kGy

Dung dịch chitosan	Mw, kDa	Mn, kDa	PI, Mw/Mn
4% chitosan	7,793	4,378	1,782
4% chitosan + 0,5% H ₂ O ₂	5,098	3,272	1,558
2% chitosan + 0,5% H ₂ O ₂	2,502	1,173	1,412

Kết quả về chỉ số phân tán KLPT (PI) của chitosan cắt mạch bức xạ ghi nhận được cho thấy rằng, phản ứng cắt mạch càng sâu thì OC thu được có KLPT càng thấp và PI càng nhỏ, nghĩa là OC có chiều dài chuỗi phân tử đồng đều hơn. Cụ thể là, giá trị PI đạt lần lượt là ~1,78; 1,56; và 1,41 tương ứng đối với OC KLPT 7,8 kDa (từ dung dịch 4% CTS chiếu xạ); 5,1 kDa (dung dịch 4% CTS + 0,5% H₂O₂ chiếu xạ);

và 2,5 kDa (dung dịch 2% CTS 0,5% H₂O₂ chiếu xạ). Các giá trị PI trên đều thấp hơn so với chitosan ban đầu (45 kDa) là 2,78.

Xu hướng giảm PI của chitosan khi gia tăng mức độ cắt mạch cũng đã được ghi nhận trong nhiều công trình nghiên cứu khác. Điển hình như [Feng và cộng sự](#) (2008) nghiên cứu chiếu xạ cắt mạch chitosan trong dung dịch, kết quả PI 7,32 của chitosan 219 kDa ban đầu đã giảm xuống còn 1,53 đối với OC 2,1 kDa [132]. [Shen và cộng sự](#) (2011) nghiên cứu cắt mạch chitosan dị thể cũng nhận thấy sự giảm PI của chitosan cắt mạch, cụ thể là từ PI = 5,1 của chitosan ban đầu với KLPT ~500 kDa đã giảm xuống còn 3,0 đối với chitosan sau cắt mạch bức xạ có KLPT ~100 kDa [101]. [Hai và cộng sự](#) (2019) đã công bố kết quả giảm PI của chitosan theo thời gian phản ứng khi cắt mạch bằng H₂O₂, PI = 2,49 của chitosan ban đầu 91 kDa giảm xuống còn 1,52 đối với OC 3,8 kDa nhận được sau 720 giờ phản ứng [9]. Hơn nữa, [Duy và cộng sự](#) (2011) nghiên cứu cắt mạch chitosan đồng thể bằng phương pháp kết hợp chiếu xạ + H₂O₂, kết quả cho thấy PI của chitosan giảm theo chiều tăng liều xạ, PI = 2,26 của chitosan 110 kDa trước chiếu xạ đã giảm xuống còn 1,42 đối với mẫu chiếu xạ 20 kGy (OC 5,4 kDa) [27]. Các tác giả trên cũng đã kết luận khi tăng liều xạ cắt mạch sẽ giảm KLPT, giảm PI và giảm độ kết tinh của chitosan. Mức độ kết tinh của polysaccharide thường được đánh giá thông qua giản đồ nhiễu xạ tia X (XRD).



Hình 3.12: Giản đồ XRD của chitosan 45 kDa và oligochitosan có KLPT khác nhau

Chitosan có trạng thái cấu trúc bán kết tinh (vùng kết tinh đan xen với vùng vô định hình). Độ kết tinh của chitosan được quyết định chủ yếu bởi mức độ liên kết

hydro nội phân tử và liên kết hydro ngoại phân tử để hình thành vùng tập hợp các chuỗi phân tử chitosan có trật tự sắp xếp chặt chẽ. Liên kết hydro nội phân tử được hình thành giữa các nguyên tử oxy O3(n) và O5(n+1) bất qua các liên kết glycoside trên cùng chuỗi phân tử chitosan; và các liên kết hydro ngoại phân tử được hình thành nguyên tử oxy của nhóm hydroxymetyl (O6) của một chuỗi với nguyên tử nitơ amin (N2) của đơn vị D-glucosamine của một chuỗi khác [143].

Kết quả giản đồ XRD của chitosan ban đầu (45 kDa) và các OC có KLPT khác nhau thu được sau chiếu xạ cắt mạch được trình bày ở Hình 3.12. Chitosan 45 kDa có 02 đỉnh nhiễu xạ rõ nét tại các góc nhiễu xạ 2θ $10,2^\circ$ và $19,8^\circ$. Kiểu nhiễu xạ này được cho là đặc trưng cấu trúc bán tinh thể của chitosan từ vỏ tôm [31]. Trong khi đó giản đồ XRD của các OC có sự thay đổi, cường độ tại đỉnh $10,2^\circ$ giảm dần và độ rộng tại đỉnh $\sim 20^\circ$ tăng lên theo chiều giảm KLPT của OC cắt mạch. Điều này đồng nghĩa với sự giảm mật độ liên kết hydro dẫn đến giảm độ kết tinh, tăng vùng cấu trúc vô định hình và tăng khả năng hòa tan của sản phẩm OC cắt mạch [15, 89, 139, 143].

Kết quả nhận được cũng phù hợp với kết quả của Muley và cộng sự (2019) [77]. Độ kết tinh của chitosan từ vỏ tôm được tính từ giản đồ XRD là $\sim 80\%$ [109], trong khi đó OC chỉ trong khoảng $8\% - 20\%$ tùy thuộc vào KLPT [15]. Hien và cộng sự (2012) đã thông báo rằng OC 2,7 kDa (chế tạo bằng chiếu xạ + H_2O_2) thì tan hoàn toàn trong nước [26]. Hơn nữa, hiện tượng tăng cấu trúc vô định hình và tăng khả năng hòa tan còn được ghi nhận trong trường hợp cắt mạch alginate (một polysaccharide chiết xuất từ rong biển) như đã được báo cáo bởi El-Mohdy (2017). Tác giả này đã bàn luận rằng, khi chiếu xạ cắt mạch các polysaccharide sẽ gây ra sự phá hủy hệ thống trật tự của các liên kết hydro ngoại phân tử. Do đó, độ linh động của chuỗi phân tử chỉ còn bị ảnh hưởng bởi liên kết hydro nội phân tử, mức độ kết tinh giảm và dẫn đến tăng độ tan của vật liệu [142].

Hoạt tính sinh học của chitosan như đã được xác nhận là có sự phụ thuộc vào độ hòa tan trong nước [4]. Song và cộng sự (2022) cũng đã xác nhận việc xử lý cắt mạch chitosan bằng bức xạ ion hóa (tia gamma Co^{60} , chùm điện tử gia tốc – EB) đã làm gia tăng đáng kể hoạt tính sinh học và các tính chất hóa lý của chitosan, trong đó có khả năng hấp thụ và tạo phức với ion kim loại [131]. Cho đến nay, đã có các nghiên cứu hiệu ứng sinh học của OC có KLPT khác nhau, nhưng hầu như có kết quả nghiên cứu công bố về ảnh hưởng KLPT OC tạo phức với ion kẽm. Do đó, nghiên cứu chế tạo phức OC- Zn^{2+} từ OC có KLPT khác nhau và khảo sát đặc trưng tính chất của phức được thực hiện trong nội dung tiếp theo.

3.2. Chế tạo phức oligochitosan-Zn²⁺ và xác định đặc trưng tính chất

Chitosan và OC có chứa nhóm amin ($-NH_2$) trên các đơn vị D-glucosamine với $pK_a \sim 6,3 - 6,5$ là các tâm tạo phức quan trọng đối với các ion kim loại trong điều kiện môi trường trung tính đến kiềm; và tạo phức ổn định với các anion bằng tương tác tĩnh điện trong điều kiện axit. Không giống như chitin, chitosan tích điện dương trong môi trường axit đến trung tính với mật độ điện tích toàn hệ, và do đó khả năng hấp phụ của nó phụ thuộc vào độ pH và ĐĐA. Các ion kim loại chuyển tiếp như đồng và kẽm có ái lực cao với các nhóm chức và khả năng tạo phức mạnh với chitosan hoặc OC [104]. Chitosan có ĐĐA thấp thì khả năng tạo phức khó xảy ra [92].

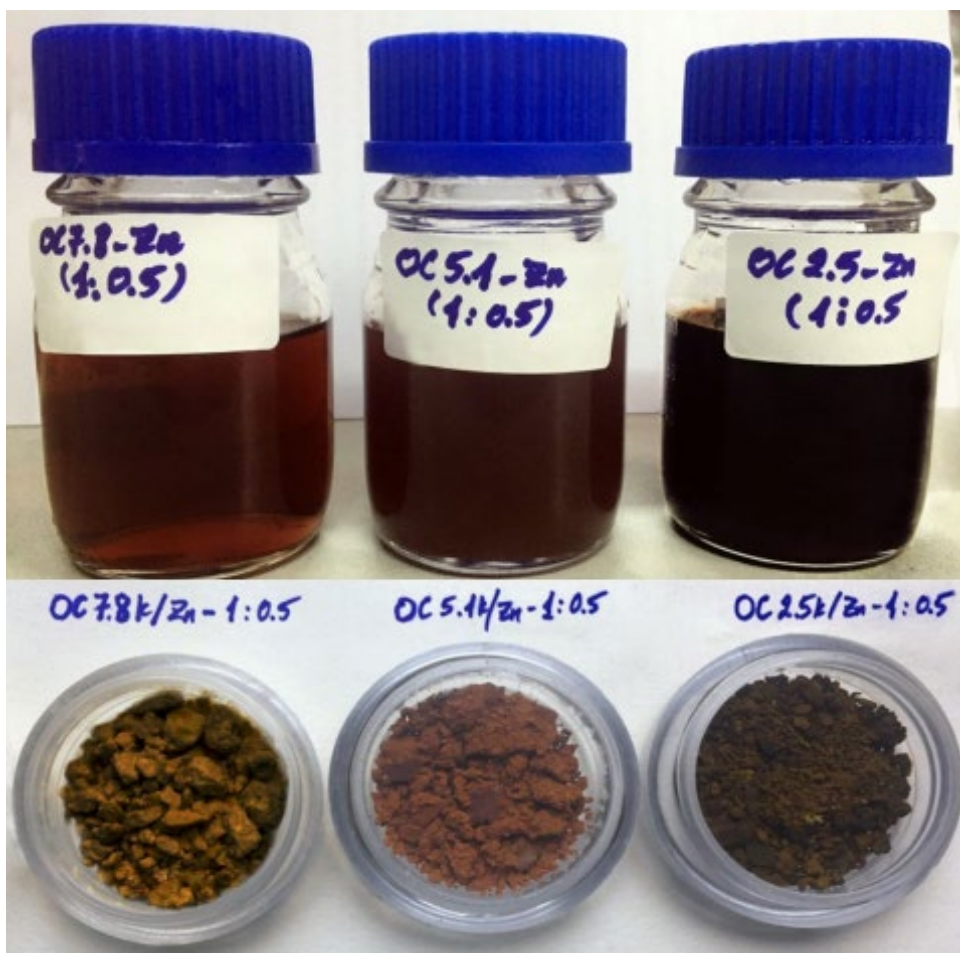
Ngoài ra, khả năng liên kết phức với kim loại ion và anion của các polymer này còn chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác, điển hình là bản chất kim loại, độ kết tinh, khối lượng phân tử, và tỷ lệ phần mol [143, 144]. Kết quả nghiên cứu tạo phức chitosan với đồng (chitosan-Cu²⁺) cho thấy pH môi trường phản ứng nhỏ hơn 5 và chuỗi phân tử có số đơn vị monomer glucosamine nhỏ hơn 6 (tương đương KLPT $\sim 1,1$ kDa) thì phản ứng tạo phức không đáng kể. Do ở pH thấp thì các nhóm amin ưu tiên phản ứng proton hóa tạo dạng ($-NH_3^+$) và chuỗi quá ngắn sẽ thuận lợi cho tổ chức không gian các phân tử OC bao quanh ion kim loại hay tạo dạng liên kết treo (pendant model) có độ ổn định thấp [41].

Khi chitosan cắt mạch có KLPT thấp, tăng tính hòa tan và do đó việc điều chỉnh pH dung dịch OC đạt khoảng 5 – 6 thuận lợi hơn so với dung dịch chitosan KLPT lớn. Tuy nhiên theo tìm hiểu từ nhiều nguồn tài liệu thì cho đến thời điểm này có khá ít kết quả nghiên cứu chế tạo phức oligochitosan-Zn²⁺ (OC-Zn²⁺) được công bố. Từ thông tin trên, trong nghiên cứu này sử dụng loại OC có KLPT từ 2,5 kDa đến 7,8 kDa để phản ứng tạo phức với ion kẽm trong điều kiện pH điều chỉnh đến $\sim 5,5$.

Kết quả Hình 3.13 cho thấy các phức OC-Zn²⁺, ở dạng dung dịch và dạng bột được chế tạo từ các OC có KLPT khác nhau nhưng cùng tỷ lệ phần mol ($-NH_2/Zn^{2+}$) là 1/0,5, có màu sắc vàng nâu cho đến nâu đen và có vẻ đậm hơn so với dạng tương tự của các OC tương ứng. Tuy nhiên, sự khác biệt về mức độ thay đổi màu này thì khó phát hiện bằng mắt thường. Kết quả nhận được về sự thay đổi màu của phức OC-Zn²⁺ cũng tương tự như kết quả của các công trình trước đây, nghiên cứu chế tạo vật liệu phức carboxymethyl chitosan với kẽm [91, 98].

Theo báo cáo của Nagasawa và cộng sự (2000), màu nâu của các oligosaccharide hình thành sau chiếu xạ cắt mạch là do hình thành các sản phẩm phụ chứa liên kết đôi tạo nên. Nhóm tác giả này thực hiện xử lý màu nâu của oligoalginate bằng sục khí ozon (O₃), sau quá trình oxi hóa bằng O₃, màu nâu và đỉnh hấp thụ UV-

Vis tại bước 265 nm đặc trưng của liên kết C=O đã không còn [145]. *Rhazi và cộng sự* (2002) suy luận rằng do sự xuất hiện cặp điện tử dùng chung (electron doublet) trong liên kết của ion kim loại với nhóm chức năng của chitosan dẫn đến dịch chuyển đặc trưng hấp thụ bước sóng ánh sáng sang vùng khả kiến tạo nên sự thay đổi màu của sản phẩm phức [41].

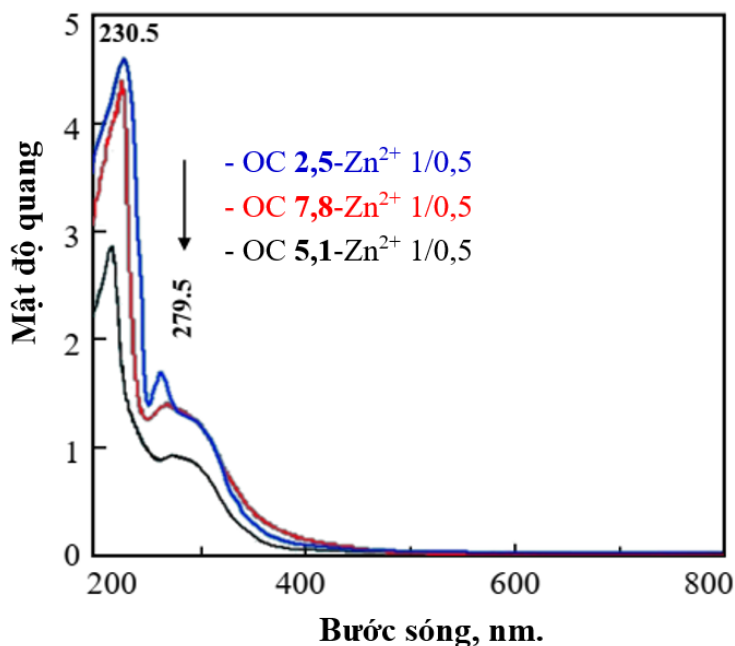


Hình 3.13: Hình ảnh dung dịch và bột của phức oligochitosan- Zn^{2+} theo KLPT oligochitosan khác nhau, tại cùng tỷ lệ phần mol 1/0,5

Từ trái qua phải: phức OC- Zn^{2+} từ tạo OC 7,8 kDa; 5,1 kDa; 2,5 kDa tại cùng tỷ lệ phần mol ($-NH_2/Zn^{2+}$) là 1/0,5.

Hơn nữa, quan sát trên phổ UV-Vis của phức OC- Zn^{2+} cho thấy có sự thay đổi rõ ràng phổ UV-Vis của OC ban đầu khi so sánh kết quả phổ UV-Vis của phức ở Hình 3.14 với kết quả UV-Vis của OC có KLPT khác nhau như ở Hình 3.8. Kẽm ion không có đỉnh hấp thụ quang phổ UV-Vis [91]. Tuy nhiên sau phối trộn với dung dịch OC để tạo phức, kết quả cho thấy đỉnh hấp thụ quang phổ UV-Vis cực đại (λ_{max}) của các OC trong khoảng $\lambda_{max} \sim 207 \text{ nm} - 211 \text{ nm}$ đã dịch chuyển sang vùng có bước sóng λ_{max} lớn hơn, cụ thể là λ_{max} 230,5 nm; 227,0 nm; và 219,5 nm tương ứng đối với

các dung dịch phức OC-Zn²⁺ (tỷ lệ mol 1/0,5) có KLPT OC lần lượt là 2,5 kDa; 5,1 kDa; và 7,8 kDa. Đồng thời cường độ tại λ_{\max} ~207 nm – 211 nm và vùng λ_{\max} ~265 nm – 280 nm cũng tăng cao so với λ_{\max} của OC tương ứng. Sự dịch chuyển λ_{\max} và thay đổi tăng cường độ được giải thích là do khi tương tác giữa ion kim loại với các nhóm chức năng như amido, amin, OH và C=O sẽ làm chuyển dịch điện tử của các liên kết giữa orbital n - π^* , π - π^* , d - d, và orbital σ của phối tử (chitosan hay OC) với orbital 3d của ion chelate (Cu²⁺, Zn²⁺) [41].



Hình 3.14: Phổ UV-Vis của phức oligochitosan-Zn²⁺ với OC KLPT khác nhau, cùng tỷ lệ phần mol 1/0,5

Tuy nhiên, trong phức OC2,5-Zn²⁺ tạo từ OC 2,5 kDa, chỉ đỉnh λ_{\max} ~265 nm xuất hiện rõ nét với cường độ cao và khác biệt so với phức OC5,1-Zn²⁺ và OC7,8-Zn²⁺ (tăng cường độ 272 nm – 290 nm), mà kiểu thay đổi này được cho là hấp thụ đặc trưng của phức dạng treo (pendant) có độ ổn định kém. Nguyên nhân có thể là do liên quan đến giới hạn độ dài của chuỗi OC [41] và khác nhau về độ deacetyl (ĐĐA của OC 2,5 kDa là ~72% so với OC 7,8 kDa và OC 5,1 kDa là ~88%) [39].

KLPT của OC ở đây là giá trị trung bình, do vậy trong dung dịch OC sau cắt mạch sẽ chứa phần có độ dài phân tử nhỏ hơn giá trị KLPT đo được. Mặc dù vậy, các kết quả sự thay đổi đặc trưng hấp thụ quang học trong các dung dịch phức OC-Zn²⁺ nêu trên chứng tỏ phản ứng tạo phức diễn ra giữa Zn²⁺ với OC, tương tự như trường hợp tạo phức chitosan hoặc OC với đồng [39, 41]. Từ phân tích kết quả phổ UV-Vis [Hình 3.14](#) có thể xác nhận rằng các phức OC-Zn²⁺ (tỷ lệ mol 1/0,5) được tạo từ OC KLPT 5,1 kDa hoặc 7,8 kDa có cấu trúc dạng cầu nối (bridge) ổn định chiếm ưu thế.

Do đó, lựa chọn loại OC 5,1 kDa tạo phức OC-Zn²⁺ để đánh giá ảnh hưởng của tỷ lệ phần mol khác nhau đến đặc trưng tính chất của phức.



Hình 3.15: Hình ảnh dung dịch và bột của phức oligochitosan-Zn²⁺ theo tỷ lệ phần mol khác nhau, tại cùng KLPT OC 5,1 kDa

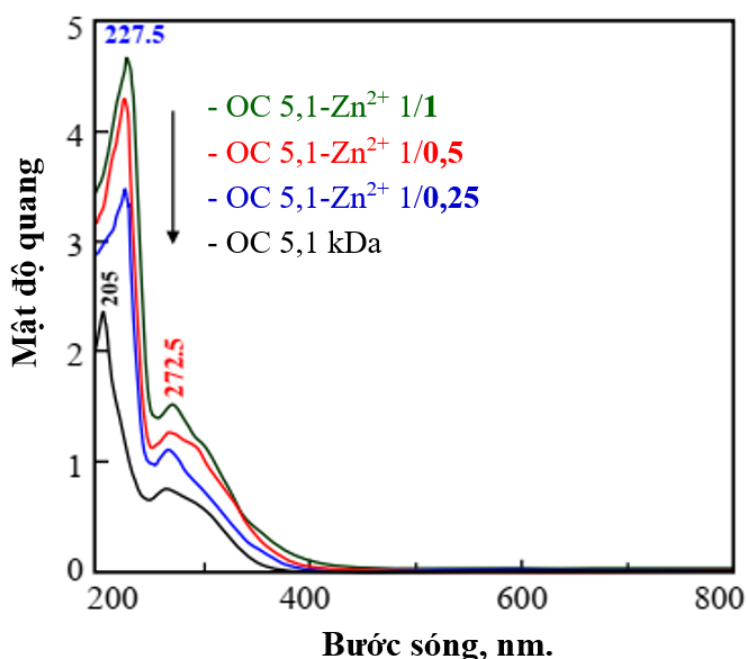
Từ trái qua phải: phức OC-Zn²⁺ từ OC 5,1 kDa và Zn²⁺ với tỷ lệ phần mol ($-NH_2/Zn^{2+}$) là 1/0,25; 1/0,5; và 1/1.

Sự thay đổi màu sắc và phổ UV-Vis cũng được quan sát đối với các mẫu phức OC5,1-Zn²⁺ với tỷ lệ phần mol ($-NH_2/Zn^{2+}$) khác nhau. Kết quả Hình 3.15 cho thấy màu dung dịch và bột của các phức OC5,1-Zn²⁺ chuyển từ vàng nâu sang nâu sẫm và nâu đậm khi tăng nồng độ Zn²⁺ hay là giảm theo chiều giảm tỷ lệ phần mol.

Hơn nữa, kết quả phổ UV-Vis trong Hình 3.16 cho thấy đỉnh đặc trưng của các đơn vị N-acetyl-glucosamine và D-glucosamine trên các phân tử OC ở khoảng 208 nm [146] bị dịch chuyển sang 227,5 nm trong trường hợp các phức OC5,1-Zn²⁺. Đỉnh λ_{max} quanh 227,5 nm được cho là do sự kích thích của các phân tử OC bởi sự

có mặt của các ion Zn^{2+} , theo Mekahlia và cộng sự (2009) cho đây là do các liên kết ion kim loại với oxy ($-O-M^{2+}$) [103].

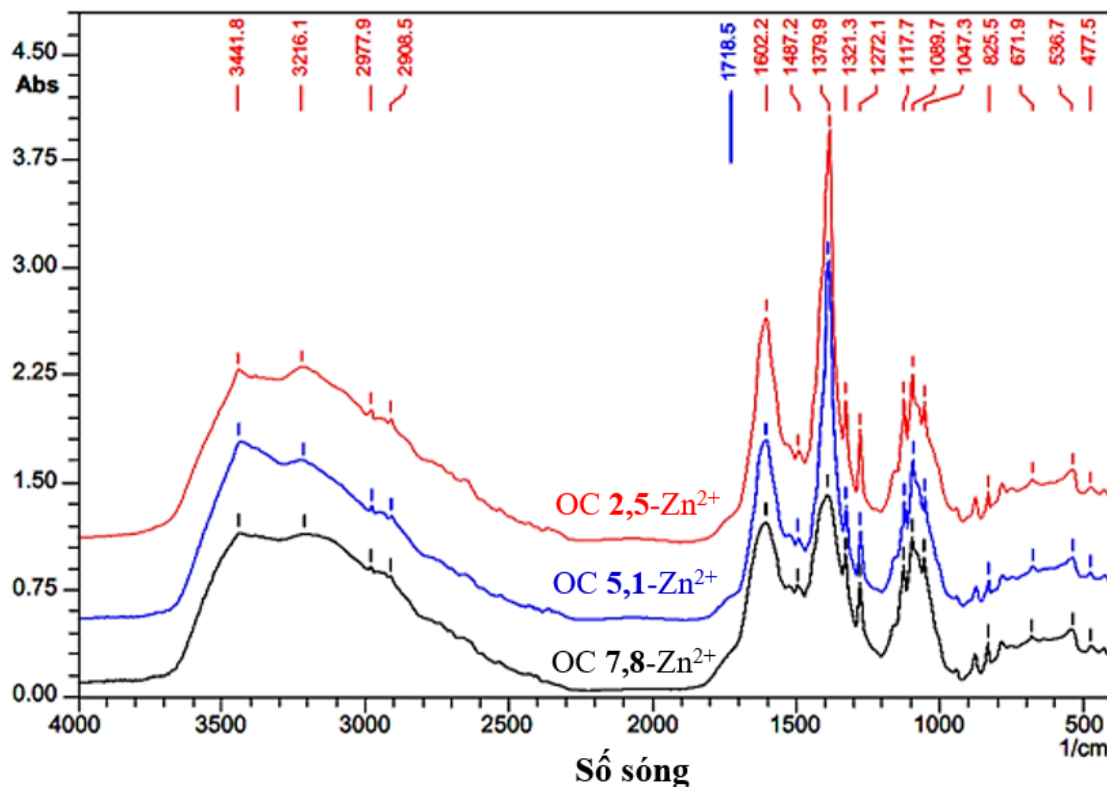
Quan sát Hình 3.16 cũng cho thấy cường độ của đỉnh tại $\lambda_{max} \sim 272$ nm được cho là liên kết C=O trong các nhóm carbonyl và hoặc là carboxyl [146] đã tăng lên khi tăng hàm lượng Zn^{2+} . Tuy nhiên, quan sát kết quả phổ UV-Vis của các mẫu phức OC5,1- Zn^{2+} có hàm lượng Zn^{2+} khác nhau còn thấy rằng: so với phức OC- Zn^{2+} (1/0,25) có hàm lượng kẽm thấp thì các phức có hàm lượng kẽm cao hơn như là OC- Zn^{2+} (1/0,5) và OC- Zn^{2+} (1/1) xuất hiện thêm đỉnh nhỏ (đỉnh vai) tại vùng $\lambda_{max} \sim 280 - 295$ nm với cường độ thấp. Kiểu hấp thụ quang phổ này được cho đặc trưng của phức có cấu trúc dạng cầu nối (bridge model) [38, 41]. Mọi sự thay đổi về màu sắc và độ hấp thụ UV-Vis của phức OC5,1- Zn^{2+} đều có thể cho rằng tương tác giữa các phân tử OC 5,1 kDa và Zn^{2+} trong dung dịch đã xảy ra thông qua các liên kết cộng kết phối trí với nhau. Như vậy, qua các kết quả phân tích về kiểu hấp thụ quang phổ UV-Vis của các phức OC- Zn^{2+} khác nhau về KLPT của OC (7,8 kDa; 5,1 kDa; và 2,5 kDa) và khác nhau về tỷ lệ phần mol của giữa OC với Zn^{2+} (tỷ lệ phần mol $-NH_2/Zn^{2+}$ là 1/1; 1/0,5; và 1/0,25) cho thấy rằng KLPT của OC và tỷ lệ phần mol có ảnh hưởng đến cấu trúc của phức. Các phức chế tạo từ OC KLPT cao và hàm lượng kẽm cao thì ưu tiên tạo phức cấu trúc dạng cầu nối ổn định hơn.



Hình 3.16: Phổ UV-Vis của phức oligochitosan 5,1 kDa với Zn^{2+} có tỷ lệ phần mol khác nhau (1/1; 1/0,5; và 1/0,25)

Theo như kết quả nghiên cứu thực nghiệm mô phỏng tương tác giữa OC với ion kim loại chuyển tiếp (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}) đã kết luận rằng cấu trúc của phức tạo

được phụ thuộc chủ yếu vào độ deacetyl, KLPT của phối tử OC, và tỷ lệ phần mol của nhóm amin với ion kim loại; tỷ lệ mol 1/0,5 và 1/1 ưu tiên tạo phức bền có cấu trúc cầu nối [38, 147]. Sự tương tác giữa ion kẽm với OC cũng được minh chứng thông qua phân tích dao động của các nhóm chức hóa học bằng kỹ thuật FTIR.



Hình 3.17: Phổ FTIR của phức oligochitosan- Zn^{2+} với OC KLPT khác nhau, cùng tỷ lệ phần mol 1/0,5

So sánh với phổ FTIR của các OC có KLPT khác nhau tương ứng như trình bày ở Hình 3.9 thì trên phổ FTIR của các mẫu phức OC- Zn^{2+} (Hình 3.17) gần như các vùng dao động đặc trưng của các nhóm chức chính của OC đều hiện diện. Tuy nhiên, trong phổ FTIR của các phức OC- Zn^{2+} có các thay đổi như sau: đỉnh ở số sóng 3419 cm^{-1} đặc trưng cho các dao động liên kết N–H, O–H và các liên kết hydro hình thành giữa chúng trên phân tử OC [38] đã dịch chuyển sang số sóng lớn hơn tại 3440 cm^{-1} , và đồng thời xuất hiện đỉnh mới ở 3220 cm^{-1} . Theo Mekahlia và cộng sự (2009), đỉnh mới này là kết quả của sự phân tách đỉnh dao động của O–H vốn bị chồng lên dao động căng của N–H khi OC hoặc chitosan tương tác với các ion kim loại [103].

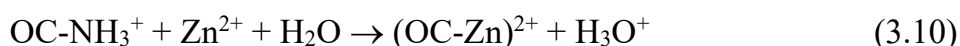
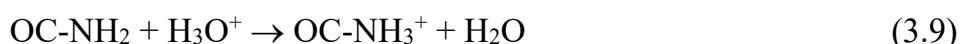
Đỉnh có cường độ cao tại 1598 cm^{-1} được cho là dao động đặc trưng của nhóm amin tự do ($-NH_2$) [148] và dao động của liên kết C–O trong carbonyl trên các phân tử OC [27] đã dịch chuyển sang số sóng lớn hơn $\sim 1602\text{ cm}^{-1}$ trong mẫu phức OC- Zn^{2+} . Bên cạnh đó, đỉnh ở mức $\sim 1420\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động uốn của –OH

và dao động C–H của –CH₂ và –CH₃ bị chuyển dịch sang số sóng thấp hơn tại vùng 1380 cm⁻¹, sự thay đổi này dẫn đến tăng cường độ dao động của –CH₃ tại các amide khi các nhóm –OH, –NH₂ tham gia tương tác với ion kim loại [148]. Đỉnh tại vùng số sóng ~1064 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động của –OH (bậc 2 tại vị trí C3) và ~1037 cm⁻¹ đặc trưng dao động của –OH bậc một (tại vị trí C6) [38, 103] chuyển sang vùng có số sóng lớn hơn tương ứng là ~1090 cm⁻¹ và 1047 cm⁻¹.

Ngoài ra, các đỉnh mới ở 536 cm⁻¹ và 478 cm⁻¹, được cho là các dao động đặc trưng của liên kết N–Zn và liên kết O–Zn [36, 37] cũng đã quan sát thấy trong các phức OC-Zn²⁺. Hơn thế nữa, đỉnh ~1718 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động C=O của nhóm carboxyl hay carbonyl trên OC hoàn toàn biến mất trong phổ FTIR của các phức OC-Zn²⁺, kết quả này gần như chưa có công trình nghiên cứu nào công bố.

Từ tất cả những thay đổi trên phổ FTIR của các mẫu phức OC-Zn²⁺ đã chứng tỏ rằng ion kẽm tạo phức với các OC thông qua liên kết với nhóm amin (–NH₂), hydroxyl (–OH), và carboxyl hoặc carbonyl nếu có trên phân tử OC. Cấu trúc của phức OC-Zn²⁺ cũng có thể tồn tại dưới hai dạng: cầu nối và dạng treo như được công bố rộng rãi bởi các tác giả khác [36, 38, 147, 148].

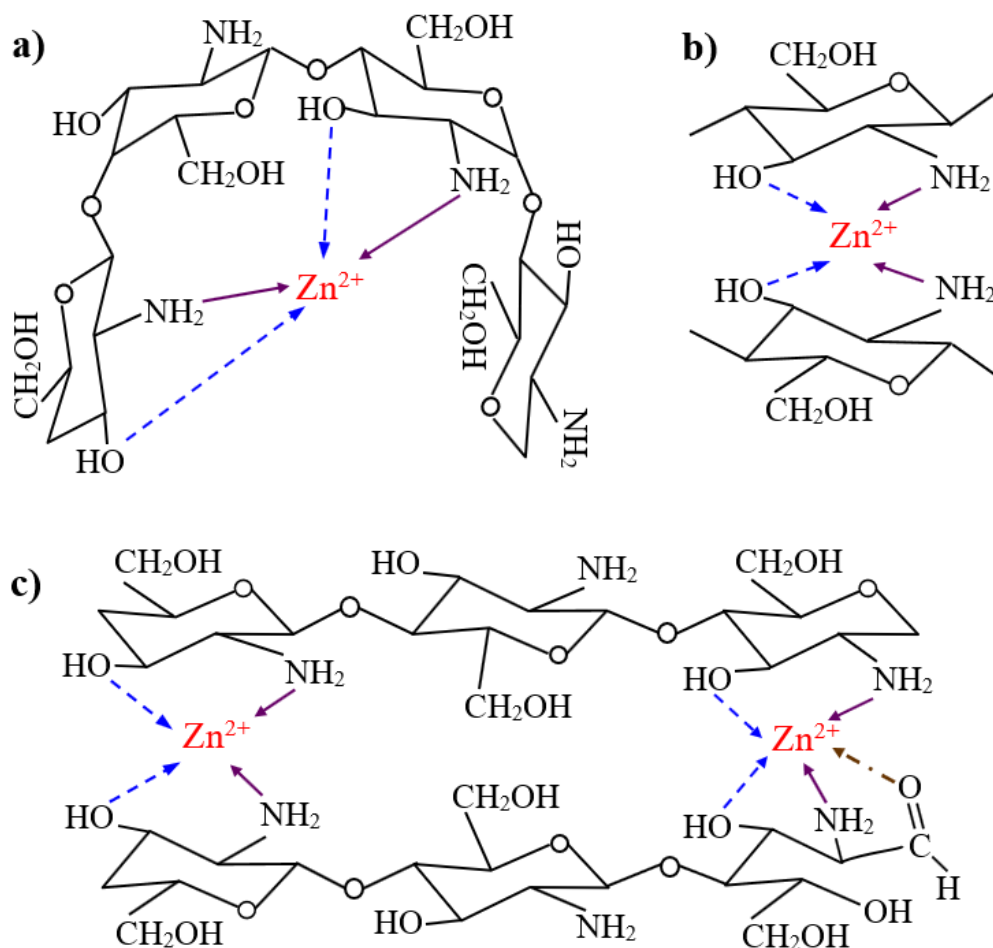
Dựa trên kết quả phân tích và đề nghị của *Rhazi và cộng sự* (2002) về cơ chế tạo phức OC-Cu²⁺ [41] và của *Wang và cộng sự* (2004) về cơ chế tạo phức chitosan-Zn²⁺ [36] cùng với các kết quả thu được trong nghiên cứu này, có thể nêu ra cơ chế tạo phức OC-Zn²⁺ diễn ra theo các phản ứng sau:



Trong đó OC là phối tử đóng vai trò là một bazơ hay chất cho điện tử, Zn²⁺ đóng vai trò là một axit hay chất nhận điện tử theo thuyết axit–bazơ của Lewis.

Như vậy, trong quá trình phản ứng tạo phức có sự cạnh tranh giữa phản ứng proton hóa (phản ứng 3.9) với phản ứng tạo phức (phản ứng 3.11) [92], đồng thời trong quá trình tạo phức cũng ly giải H⁺ (phản ứng 3.10) dẫn đến pH thiên về axit. Mà khi pH giảm đến nhỏ hơn 5 thì cản trở phản ứng tạo phức hoặc tạo phức cấu trúc dạng treo có độ bền thấp (như đã được đề cập trước đây). Do đó việc lựa chọn tỷ lệ phần mol của oligochitosan/Zn²⁺ có ý nghĩa quan trọng để tạo phức OC-Zn²⁺ có cấu trúc ổn định dạng cầu nối chiếm ưu thế.

Patale và cộng sự (2011) đã công bố kết quả rất đáng để tham khảo là khi tăng hàm lượng kẽm vượt quá tỷ lệ tối ưu thì hiệu suất tạo phức carboxymethyl- Zn^{2+} giảm mạnh, đồng thời tăng tỷ lệ phức không bền dạng treo trong hệ phản ứng [98]. *Wang và cộng sự* (2004, 2005) đã kết luận tỷ lệ mol chitosan/ Zn^{2+} 1/0,5 đến 1/1 là thích hợp tạo cấu trúc dạng cầu nối [36, 148]. *Zhang và cộng sự* (2018) bằng thực nghiệm mô phỏng cũng xác nhận tỷ lệ phần mol của $-NH_2/Zn^{2+}$ từ 1/0,5 đến 1/1 là thuận lợi để tạo phức cấu trúc dạng cầu nối [147]. Hơn nữa, kết quả nghiên cứu của *Khan và cộng sự* (2013) cũng cho thấy rằng các phức chitosan- Zn^{2+} sau tính toán chuyển đổi thành tỷ lệ mol là 1/0,5 đến 1/1, có hiệu ứng diệt khuẩn hiệu quả [37]. Trên cơ sở đó có thể suy luận rằng các phức OC- Zn^{2+} chế tạo được như trong nghiên cứu này có cấu trúc chủ yếu là dạng cầu nối (Hình 3.18) và kỳ vọng thể hiện hoạt tính sinh học cao.

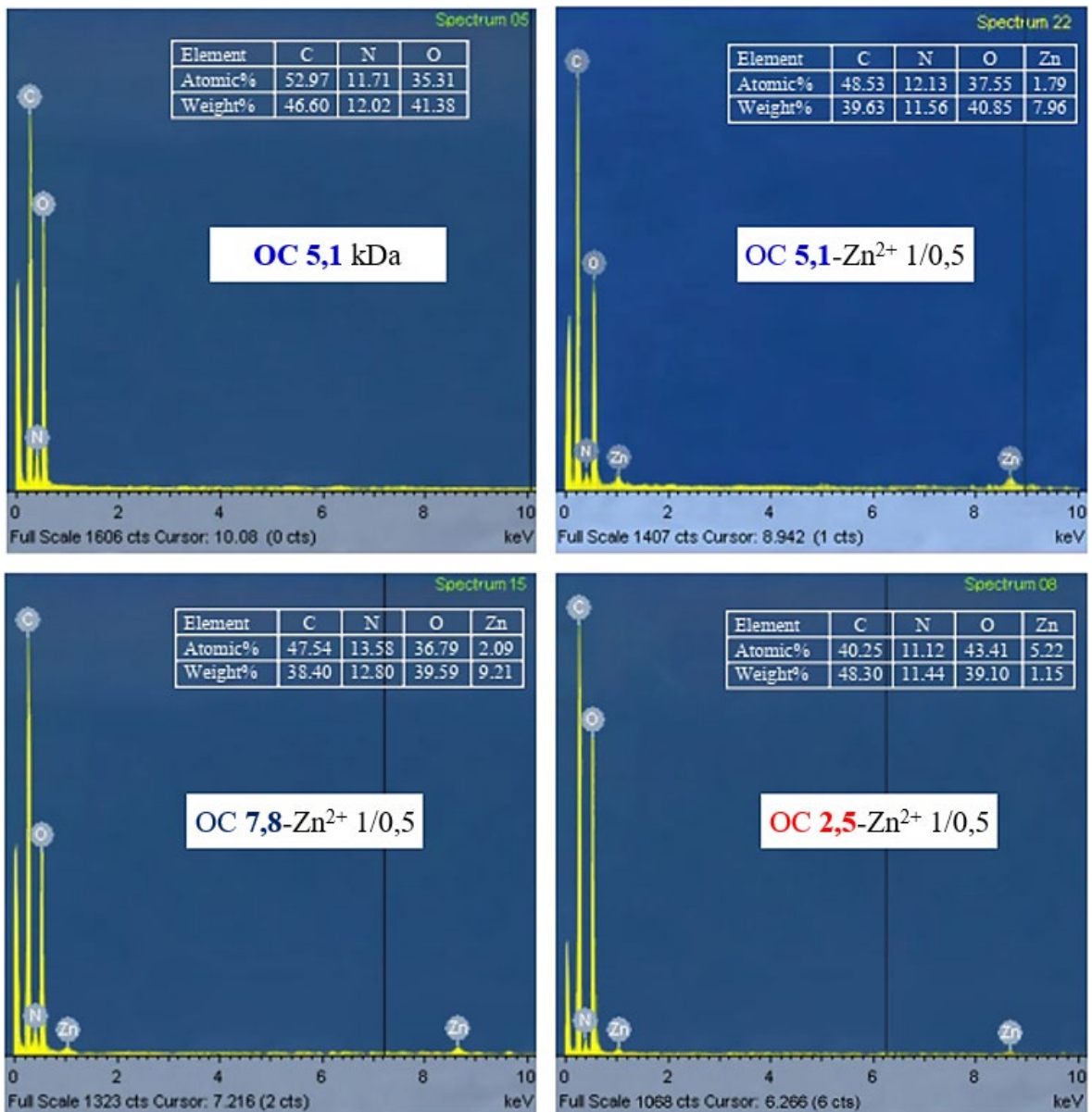


Hình 3.18: Mô hình kiểu cấu trúc liên kết phối trí của phức oligochitosan- Zn^{2+}

a) dạng cầu nối trên cùng một chuỗi phân tử OC, b) dạng cầu nối trên các chuỗi phân tử OC khác nhau, c) dạng cầu nối trên các chuỗi phân tử OC khác nhau có phối trí của Zn^{2+} với nhóm carbonyl

Để có thêm cơ sở xác nhận phức OC- Zn^{2+} chế tạo được, thực hiện phân tích thành phần nguyên tố bằng phương pháp đo phổ tán sắc năng lượng tia X (EDX) của

OC và phức OC-Zn²⁺ dạng bột thu được sau khi rửa với ethanol, làm khô và nghiền mịn. Kết quả thành phần nguyên tố theo phần trăm khối lượng và phần trăm số nguyên tố được trình bày trong [Hình 3.19](#). Kết quả cho thấy mẫu OC chứa 3 loại nguyên tố là C, N, và O với phần trăm khối lượng tương ứng là 46,6; 12,0; và 41,4%. Trên phổ EDX của OC 5,1 kDa không phát hiện thành phần tạp nhiễm. Trong khi đó, trên phổ EDX của phức OC-Zn²⁺ tạo từ các OC có KLPT khác nhau, tại cùng tỷ lệ phần mol 1/0,5 thì ngoài các thành phần nguyên tố của OC còn phát hiện được nguyên tố kẽm. Kết quả thu được cũng tương tự như công bố của [Huang và cộng sự](#) (2022) [96].



Hình 3.19: Phổ EDX của oligochitosan 5,1 kDa và phức oligochitosan-Zn²⁺ có OC KLPT khác nhau, tại cùng tỷ lệ phần mol 1/0,5

Kẽm có bức xạ tán sắc năng lượng tia X đặc trưng là K α tại 1,01 keV và L α tại 8,67 keV. Kết quả trên các bảng chèn trong [Hình 3.19](#) tương ứng cho thấy phần

trăm khối lượng kẽm (weight%) trong phức có xu hướng giảm theo chiều giảm KLPT của OC, cụ thể là 9,21%, 7,96%, và 1,15% tương ứng đối với phức OC7,8-Zn²⁺, OC5,1-Zn²⁺, và OC2,5-Zn²⁺. Nguyên nhân có thể là do khác nhau về hàm lượng giữa các dạng cấu trúc trong các phức. Kết quả hàm lượng kẽm của các OC-Zn²⁺ phân tích bằng EDX nhận được trong nghiên cứu này thì cao hơn so với báo cáo của [Mutlu và cộng sự](#) (2022) là 0,3% [110]. Nguyên nhân có thể đến từ sự khác nhau về KLPT chitosan và hàm lượng Zn²⁺.

Để xác định chính xác hơn về hàm lượng kẽm trong phức thì thường sử dụng các kỹ thuật phân tích có độ nhạy cao như: phân tích nguyên tố (elemental analysis) [36], phổ hấp thụ nguyên tử (atomic absorption spectroscopy) [103], phổ phát xạ nguyên tử cộng hưởng plasma (inductively coupled plasma - atomic emission spectroscopy – ICP-AES) [91, 96]. Kết quả phân tích bằng kỹ thuật ICP-AES về hàm lượng kẽm trong các phức OC-Zn²⁺ (theo KLPT OC và tỷ lệ phần mol khác nhau) chế tạo được trong nghiên cứu này như trình bày chi tiết trên [Bảng 3.4](#).

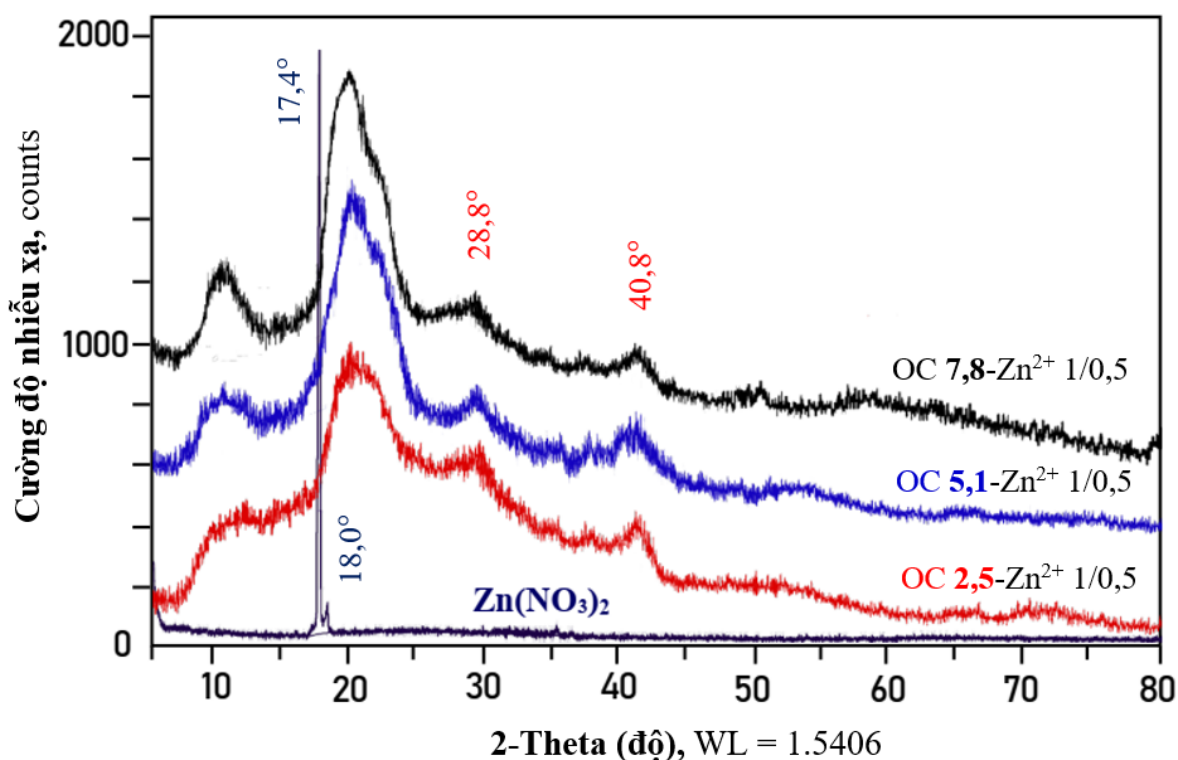
Bảng 3.4: Hàm lượng kẽm trong các phức OC-Zn²⁺ có hợp phần khác nhau

Mẫu phức	OC, (g)	Tỷ lệ mol, (-NH ₂ /Zn ²⁺)	Zn ²⁺ , (mg)	Lượng Zn ²⁺ /OC-Zn ²⁺ , (mg/g)		So với lý thuyết, (%)
				Theo lý thuyết	Phân tích- ICP	
OC2,5-Zn ²⁺	2	1/0,5	271	119,3	105,1 ± 5,8	88,1
OC7,8-Zn ²⁺	4	1/0,5	696	148,2	139,9 ± 9,7	94,4
OC5,1-Zn ²⁺	4	1/0,25	343	78,9	71,1 ± 4,4	90,1
OC5,1-Zn ²⁺	4	1/0,5	686	146,3	134,2 ± 4,9	91,7
OC5,1-Zn ²⁺	4	1/1	1370	255,2	235,6 ± 12,5	92,3

Kết quả phân tích hàm lượng kẽm trong các phức OC-Zn²⁺ từ các OC có KLPT khác nhau (7,8 kDa; 5,1 kDa; và 2,5 kDa) tại cùng tỷ lệ phần mol (-NH₂/Zn²⁺) là 1/0,5 cho thấy hàm lượng kẽm phân tích được so với hàm lượng kẽm cho vào phản ứng theo tính toán lý thuyết (hay còn gọi là hiệu suất tạo phức) của các phức có xu hướng giảm theo chiều giảm KLPT của OC. Cụ thể, hiệu suất đạt 94,4%; 91,7%; và 88,1% tương ứng với KLPT OC của phức là 7,8 kDa; 5,1 kDa; và 2,5 kDa.

Kết quả phân tích hàm lượng kẽm trong các phức OC-Zn²⁺ với OC có cùng KLPT 5,1 kDa nhưng khác nhau về tỷ lệ phần mol cho thấy hiệu suất tạo phức gần như không khác biệt. Cụ thể hiệu suất đạt 92,3%; 91,7%; và 90,1% tương ứng với tỷ lệ phần mol của phức OC-Zn²⁺ là 1/1; 1/0,5; và 1/0,25.

Kết quả hiệu suất tạo phức đạt thấp hơn ở các mẫu OC KLPT 2,5 kDa và mẫu có tỷ lệ phần mol 1/0,25 có thể do các nguyên nhân liên quan: i) số lượng các phân tử OC có độ dài nhỏ hơn 6 đơn vị glucoside (độ dài phân tử giới hạn để tạo phức) trong mẫu OC 2,5 kDa nhiều hơn so với các mẫu OC khác; ii) tạo phức dạng treo ít bền trong trường hợp hàm lượng mol Zn^{2+} thấp so với mol OC; và iii) phương pháp thu hồi bằng rửa – rửa với ethanol có thể không thu được phần phức không bền và phần OC có KLPT nhỏ. Kết quả nhận được ở trên cũng có xu hướng tương tự các công bố khác về tạo phức chitosan- Cu^{2+} [41, 103] và phức chitosan- Zn^{2+} [36, 98, 110]. Thêm vào đó, các phức OC- Zn^{2+} dạng bột chế tạo được như trong nghiên cứu này đều dễ hòa tan trong nước, điều này có thể là do sự thay đổi cấu trúc kết tinh.



Hình 3.20: Phổ XRD của muối kẽm và của phức oligochitosan- Zn^{2+} với OC KLPT khác nhau, tại cùng tỷ lệ phần mol 1/0,5

Kết quả phổ đồ XRD của $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ và của các phức OC- Zn^{2+} từ OC có KLPT khác nhau với Zn^{2+} như trình bày trên Hình 3.20. Tinh thể $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ có hai đỉnh nhiễu xạ rõ nét tại góc 2θ là $17,4^\circ$ và $18,0^\circ$, đặc trưng cho loại tinh thể đơn tà của muối kẽm nitrate (COD 9008175 trong cơ sở dữ liệu XRD). So sánh với phổ XRD của các OC có KLPT tương ứng ở Hình 3.12, các OC có một đỉnh cường độ cao ở $2\theta \sim 21,0^\circ$ và một đỉnh cường độ thấp ở vùng $2\theta \sim 10,0^\circ$ đặc trưng cho cấu trúc vô định hình của OC [27, 75]; thì phổ đồ XRD của các phức hợp OC- Zn^{2+} thể hiện ba đỉnh chính ở 2θ là $20,4^\circ$, $28,8^\circ$ và $40,8^\circ$ và cường độ tại vùng $2\theta \sim 10,0^\circ$ giảm so

với OC tương ứng. Kết quả này có thể minh chứng cho sự xảy ra tương tác giữa Zn^{2+} với OC dẫn đến hình thành pha tinh thể mới trong phức hợp OC- Zn^{2+} . Đồng thời giảm cường độ đỉnh $2\theta \sim 10,0^\circ$ là minh chứng cho sự giảm độ kết tinh của OC. Khi Zn^{2+} tham gia liên kết với nhóm $-OH$ và $-NH_2$ trên phân tử OC dẫn đến giảm mật độ liên kết hydro trong cấu trúc OC. Kết quả nhận được cũng tương tự như trường hợp phức chitosan hoặc OC với Zn^{2+} đã được công bố trước đây [37, 96, 148].

Như đã biết, độ hòa tan của chitosan hoặc OC phụ thuộc chủ yếu vào mức độ proton hóa nhóm amin và mật độ liên kết hydro trong phân tử hay độ kết tinh của chúng [92]. Rinaudo và cộng sự (2006) thông báo rằng để hòa tan chitosan thì cần lượng proton (H^+) với lượng tối thiểu ít nhất phải bằng hàm lượng nhóm amin ($-NH_2$) có trên phân tử chitosan hoặc OC [144]. Khi nhóm amin ở vị trí C2 bị proton hóa ($-NH_3^+$) dẫn đến tăng khả năng ái nước của O3 (oxy tại vị trí C3) gây phá vỡ liên kết hydro và làm tăng khả năng solvate hóa, kết quả là làm tăng độ hòa tan của chitosan [145]. Do vậy, chitosan hoặc OC khó hòa tan trong nước có $[H^+]$ thấp. Tuy nhiên, đối với trường hợp phức OC- Zn^{2+} thì khả năng hòa tan trong nước được cải thiện, có thể là do mật độ điện tích dương của nhóm amin được tăng cường và làm gia tăng tính phân cực, đồng thời khi Zn^{2+} tương tác với các nhóm chức năng của OC sẽ gây giảm mật độ liên kết hydro dẫn đến phức OC- Zn^{2+} dễ tan trong nước hơn so với OC. Tăng khả năng hòa tan của OC cũng góp phần cải thiện hoạt tính và có ý nghĩa quan trọng cho mục đích mở rộng phạm vi ứng dụng.

3.3. Hiệu lực kháng nấm *Colletotrichum truncatum* trong điều kiện phòng thí nghiệm (*in vitro*)

Trên cơ sở kết quả đã được công bố trong những nghiên cứu trước đây [8, 32, 85, 87, 149] cho thấy, OC có KLPT trong khoảng 3 – 5 kDa thể hiện hiệu ứng ức chế nấm bệnh, kích thích tăng trưởng và kích kháng bệnh hiệu quả trên cây trồng. Điển hình, kết quả nghiên cứu của Vasyukova và cộng sự (2001) cho thấy rằng OC 5 kDa thu được bằng phương pháp cắt mạch bởi enzyme có hoạt tính mạnh nhất so với các OC hoặc chitosan KLPT khác về khả năng kích kháng bệnh mốc sương (do nấm *Phytophthora infestans* gây ra) trên cây khoai tây. OC 5 kDa kích thích cây khoai tây tăng cường tổng hợp và tích lũy phytoalexin (Rishitin) chống nấm trong mô; hoạt hóa hệ thống phản vệ; tăng hoạt tính enzyme β -glucanase, lipoxygenase và chitinase chống sự thâm nhập và loại trừ nấm bệnh hiệu quả [149]. Kết quả của Tuan và cộng sự (2019) đã minh chứng OC 3 – 5 kDa thể hiện khả năng kiểm soát bệnh và kích kháng bệnh (kích tạo enzyme chitinase) hiệu quả đối với bệnh đốm nâu trên cây thanh long [87]. Hai và các cộng (2019) sự đã chứng minh OC ~5 kDa có hiệu ứng kích

thích tăng nảy mầm hạt đậu nành hiệu quả [9]. Nhóm tác giả *Dzung và cộng sự* (2017) [32], *Thuy và cộng sự* (2017) [85] đã minh chứng OC ~5 kDa được chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ đồng vận (γ Co⁶⁰ + H₂O₂) có hiệu ứng kích thích tăng trưởng và hoạt tính kích kháng bệnh thán thư (do nấm *Colletotrichum* sp.) hiệu quả trên cây ớt, đồng thời hoạt tính của OC được gia tăng rõ rệt khi tạo phức với nanosilica (nSiO₂) với nồng độ sử dụng thấp (< 100 ppm).

Dựa vào kết quả đặc trưng tính chất của OC và phức OC-Zn²⁺ ở các nội dung trên cũng cho thấy, OC 5,1 kDa chế tạo được có ĐĐA ~87 % không giảm đáng kể so với chitosan ban đầu, và đạt hiệu suất tạo phức với kẽm cao (~92 %) nên trong nội dung này lựa chọn phức OC5,1-Zn²⁺ để thực hiện đánh giá khả năng ức chế nấm *C. truncatum* gây bệnh thán thư trên đậu nành (trong điều kiện *in vitro*) theo nồng độ và tỷ lệ phần mol khác nhau.

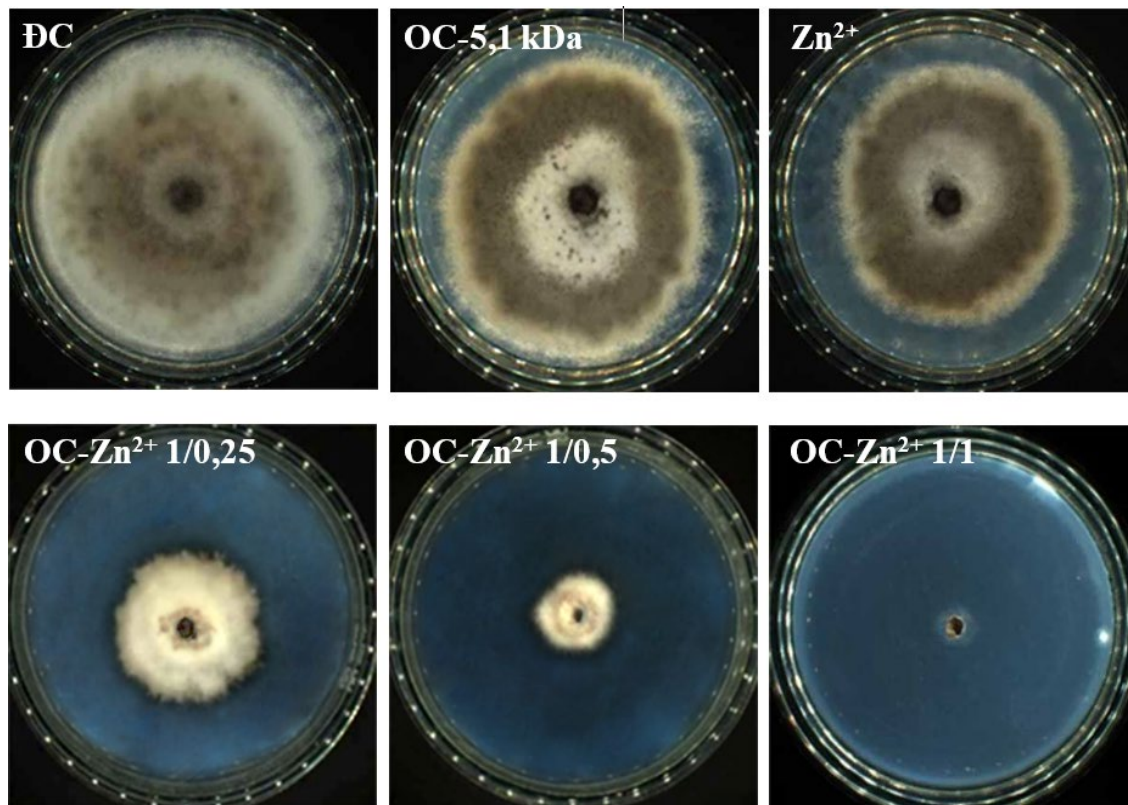
Bảng 3.5: Hoạt lực kháng nấm *C. truncatum* (AE%) theo nồng độ của oligochitosan 5,1 kDa; Zn²⁺; và phức OC5,1-Zn²⁺ với tỷ lệ phần mol khác nhau

Nghiệm thức	ĐC (0 ppm)	250 ppm		500 ppm		1000 ppm	
	D, mm	D, mm	AE, %	D, mm	AE, %	D, mm	AE, %
OC5,1	75,7 ± 2,1	75,3 ^a ± 1,5	0,4	74,7 ^a ± 1,5	1,3	67,0 ^a ± 1,7	11,5
Zn ²⁺		–	–	–	–	44,3 ^b ± 1,5	41,4
OC-Zn ²⁺ 1/0,25		61,7 ^b ± 2,1	18,5	56,7 ^b ± 1,5	25,1	18,7 ^c ± 2,5	75,3
OC-Zn ²⁺ 1/0,5		58,7 ^b ± 1,2	22,5	54,3 ^b ± 2,1	28,2	06,3 ^d ± 1,5	91,6
OC-Zn ²⁺ 1/1		52,3 ^c ± 2,5	30,4	09,3 ^c ± 2,5	87,7	<5	~100
CV%		3,05		4,02		5,49	
LSD _{0,50}		3,56		3,69		3,52	

* Các giá trị trung bình trong cùng 1 cột mang ký tự giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê với mức xác suất tin cậy $p < 0,05$. OC-Zn²⁺ là phức OC5,1-Zn²⁺ với tỷ lệ phần mol 1/0,25; 1/0,5; và 1/1. D (mm) là đường kính cụm khuẩn ty nấm, AE% là phần trăm ức chế sinh trưởng nấm. Nồng độ ppm (~mg/l) được tính trên cơ sở nồng độ của OC 5,1 kDa.

Hoạt lực ức chế nấm *C. truncatum* gây bệnh thán thư trên cây đậu nành của OC 5,1 kDa và của phức OC5,1-Zn²⁺ với các nồng độ khác nhau (250 ppm, 500 ppm, và 1.000 ppm) và một mẫu thử nghiệm Zn(NO₃)₂·6H₂O nồng độ 390 mg/l (tương đương với lượng Zn²⁺ trong phức hợp OC5,1-Zn²⁺ tỷ lệ phần mol 1/0,25 sau pha

loãng đạt nồng độ 1.000 mg OC/lít hay ~1.000 ppm OC) được đánh giá dựa trên sự phát triển đường kính hệ khuẩn ty của *C. truncatum* trên môi trường thạch đĩa PDA. Các kết quả thu được như trình bày trong [Bảng 3.5](#) và [Hình 3.21](#) cho thấy hoạt tính kháng nấm gia tăng khi tăng nồng độ OC và nồng độ phức OC-Zn²⁺.



Hình 3.21: Sự phát triển của sợi nấm *C. truncatum* trên các đĩa thạch PDA có bổ sung các chất thử nghiệm OC 5,1 kDa; Zn²⁺; và phức OC5,1-Zn²⁺ với tỷ lệ phần mol khác nhau (1/0,25; 1/0,5; 1/1)

Xu hướng tăng hiệu lực kháng nấm theo chiều tăng nồng độ của OC cũng được [Kewsuwan và cộng sự](#) (2014) ghi nhận kết quả tương tự khi thực nghiệm với chủng nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây thán thư trên cây ớt nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa PDA có bổ sung OC cắt mạch bức xạ. Cụ thể là, ở nồng độ OC từ 0,001 đến 0,01% (~10 – 100 ppm) trong PDA không cho thấy bất kỳ hoạt động ức chế nào đối với nấm *C. gloeosporioides*. Dải nồng độ OC 0,05 và 0,1% (~500 – 1.000 ppm) có hoạt tính ức chế thấp (tương ứng khoảng 11,3% – 12,7%). Đối với nồng độ cao từ 0,5% và 1% (5.000 – 10.000 ppm) thì hiệu lực ức chế nấm đạt cao trong khoảng 42,9% – 65,2%. Tác giả kết luận rằng sự phát triển nấm của *C. gloeosporioides* bị ức chế hoặc chậm lại khi môi trường nuôi cấy nấm được bổ sung 0,05% (~500 ppm) OC chiếu xạ trở lên, và OC cắt mạch bằng chiếu xạ có tiềm năng sử dụng như một chất thay thế để kiểm soát bệnh thán thư ở cây ớt [111]. Kết quả thu được cũng tương tự

như báo cáo của [Li và cộng sự](#) (2016) về hiệu quả ức chế nấm *Fusarium sambucinum* gây bệnh thối khô trên cây tiêu Tứ Xuyên (*Zanthoxylum bungeanum*) bởi OC, và hiệu lực ức chế nấm theo kiểu phụ thuộc nồng độ trong khoảng khảo sát 200 – 1.000 ppm. Hiệu ứng ức chế nấm bởi OC được tác giả nhận định là do kết quả của sự tương tác trực tiếp của chúng với nấm gây bệnh thối khô ở thân cây *Z. bungeanum* [150].

Ngoài ra, kết quả [Bảng 3.5](#) cũng cho thấy phức OC5,1-Zn²⁺ với hàm lượng Zn²⁺ càng cao thì thể hiện hoạt tính kháng nấm càng mạnh. Cụ thể, các giá trị AE lần lượt là 75,1%; 91,7%; và ~100% tương ứng đối với phức OC5,1-Zn²⁺ có tỷ lệ mol (–NH₂/Zn²⁺) lần lượt là 1/0,25; 1/0,5; và 1/1.

Khi so sánh giữa các mẫu thử nghiệm như trong [Bảng 3.5](#), hoạt tính kháng nấm của phức OC5,1-Zn²⁺ cao hơn so với hoạt tính kháng nấm của chỉ OC và hoặc là Zn²⁺. Cụ thể, các giá trị AE đạt lần lượt là 11,6%; 44,1%; và 75,1% tương ứng với OC 5,1 kDa, Zn²⁺ và phức OC5,1-Zn²⁺ tỷ lệ phần mol 1/0,25. Những kết quả này cũng chỉ ra rằng giá trị AE của phức OC-Zn²⁺ đạt cao hơn tổng giá trị AE của OC và Zn²⁺. Theo [Duy và cộng sự](#) (2011) và [Guibal và cộng sự](#) (2014) đã nêu rằng hiệu ứng đồng vận là hiệu ứng tác động đồng thời của hai tác nhân (hoặc chất phản ứng) lớn hơn tổng hiệu ứng của các tác nhân tác động riêng rẽ [27, 92]. Dựa vào khái niệm trên và kết quả hoạt tính kháng nấm thu được cho thấy tác dụng đồng vận trong hiệu quả kháng nấm đối với nấm *C. truncatum* của OC và Zn²⁺ đã diễn ra khi cả hai được kết hợp thành dạng phức OC-Zn²⁺.

Hoạt tính kháng nấm đồng vận của chitosan và Cu²⁺ đối với nấm *Botrytis cinerea* gây bệnh mốc xám và nấm *Plasmopara viticola* gây bệnh sương mai trên cây nho cũng đã được [Aziz và cộng sự](#) (2006) ghi nhận [56]. [Wang và cộng sự](#) (2004) cũng đã báo cáo rằng hoạt tính kháng khuẩn của phức chitosan-Zn²⁺ cao hơn so với chitosan từ 2 – 8 lần và so với Zn²⁺ từ 4 –16 lần [36]. Ngoài ra, [Khan và cộng sự](#) (2013) cũng thông báo rằng phức chitosan-Zn²⁺ thể hiện hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm phổ rộng và hiệu ứng của chitosan được tăng cường khi tạo phức với kẽm (hiệu ứng đồng vận). Đồng thời phức chitosan-Zn²⁺ tỷ lệ mol 1/1 thể hiện hiệu quả kháng khuẩn, kháng nấm cao hơn so với phức chitosan-Zn²⁺ tỷ lệ mol 2/1, nghĩa là nồng độ kẽm trong phức càng cao thì hiệu ứng kháng vi sinh vật càng mạnh [37].

Nguyên nhân xảy ra hiệu ứng đồng vận của phức có thể được giải thích là do khi chitosan hoặc OC tạo phức chelate với Cu²⁺ hay với Zn²⁺, mật độ điện tích dương trên phân tử của chúng được tăng cường. Do đó, các phức thuận lợi hơn cho sự tương tác với các thành phần anion của tế bào vi sinh vật và thể hiện hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm cao hơn so với chitosan hoặc OC [36, 37, 56].

Như đã được công bố rộng rãi, hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của chitosan hoặc OC bắt nguồn từ bản chất polycation (polymer tích điện dương) của nó. Tương tác tĩnh điện giữa chitosan mang điện tích dương và các thành phần chủ yếu là anion mang điện tích âm trên bề mặt tế bào vi sinh vật (chẳng hạn như lipopolysaccharide và protein bề mặt tế bào) đóng vai trò chính trong hoạt động kháng khuẩn. Những tương tác này làm thay đổi hoặc phá vỡ cấu trúc màng, từ đó ly giải thành phần nội bào và sau cùng dẫn đến gây chết tế bào. Hơn nữa, chitosan có KLPT thấp hoặc là OC được cho là có thể dễ dàng thâm nhập vào tế bào vi sinh vật, tạo tương tác với DNA, ức chế tổng hợp mRNA và dịch mã tổng hợp protein [57, 150, 151].

Trên cơ sở kết quả thu được ở **Bảng 3.5** và **Hình 3.21**, các phức OC-Zn²⁺ với tỷ lệ phần mol (–NH₂/Zn²⁺) là 1/0,5 được lựa chọn để tiếp tục khảo sát.

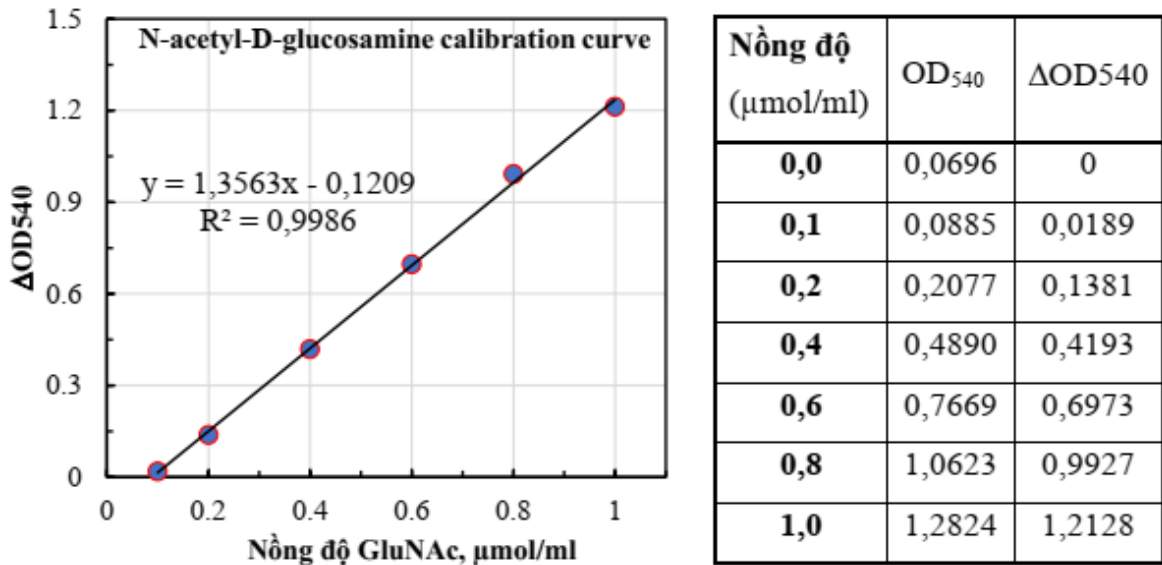
3.4. Hiệu ứng sinh học của phức oligochitosan-Zn²⁺ trên cây đậu nành trồng trong nhà kính

Chitosan, được phát hiện lần đầu tiên năm 1859 bởi Rouget - nhà sinh lý học người Pháp, là polymer sinh học có nhiều đặc tính hữu ích nên thu hút nhiều sự quan tâm nghiên cứu. OC, một sản phẩm từ chitosan cắt mạch, có hoạt tính sinh học (bảo vệ, kích thích sinh trưởng, kích kháng bệnh cho cây trồng) đã được minh chứng là cao hơn so với chitosan [4, 116]. Tuy nhiên, với mục tiêu khai thác tối đa các tính năng quý giá của loại polysaccharide tự nhiên này, các nhà nghiên cứu luôn tiếp tục thực hiện cải biến tạo chế phẩm có hoạt tính sinh học vượt trội hơn. Tạo phức chất giữa chitosan/OC với ion kim loại (Cu²⁺, Zn²⁺) được xem là một trong những giải pháp mang lại hiệu quả cao do đảm bảo và gia tăng tính năng của polymer và của ion kim loại, đồng thời tăng hiệu quả sử dụng ion kim loại và hạn chế mức ly giải kim loại ra môi trường [38, 96]. Phức chitosan-Cu²⁺ đã được minh chứng có hoạt tính kháng bệnh cây trồng theo tác động đồng vận (synergistic effect) [151]. Phức chitosan-Zn²⁺ hoặc OC-Zn²⁺ thể hiện hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm hiệu quả cao [36, 37]. Tuy nhiên, cho đến nay thông tin về hiệu ứng kích thích sinh học (biostimulating) trên cây trồng của phức OC-Zn²⁺ còn rất hạn chế. Trong nghiên cứu này đã thực hiện và trình bày kết quả hiệu ứng kích thích sinh học (sinh trưởng, phòng trừ bệnh) của các phức OC-Zn²⁺ trên cây đậu nành, với các kết quả thu được như sau:

3.4.1. Hiệu quả kích tạo chitinase, kích thích sinh trưởng và kiểm soát bệnh trên cây đậu nành của phức oligochitosan-Zn²⁺ với oligochitosan KLPT khác nhau

Để xác định được hoạt tính enzyme chitinase từ mẫu lá đậu nành bằng phương pháp so màu, trước hết cần lập đường chuẩn của sản phẩm thủy phân cơ chất đặc hiệu

của enzyme (huyền phù chitin). Kết quả mối tương quan giữa nồng độ đường khử N-acetyl-D-glucosamine (GluNAc) với giá trị mật độ quang (OD_{540}) hấp thụ UV-Vis đo tại bước sóng 540 nm của dung dịch đường khử sau phản ứng tạo màu với DNS (Hình 3.22). Trong khoảng nồng độ GluNAc 0,1 – 1,0 $\mu\text{mol/ml}$ có hệ số tương quan cao ($R = 0,9993$) và phương trình đường chuẩn thiết lập được là: $OD_{540} = 1,3563X - 0,1209$ (với X là nồng độ $\mu\text{mol/ml}$ của GluNAc). Dựa vào đường chuẩn này để tính toán giá trị hoạt tính enzyme chitinase trên tất cả mẫu lá đậu nành thí nghiệm.



Hình 3.22: Đường chuẩn N-acetyl-D-glucosamine (GluNAc) theo mối tương quan nồng độ ($\mu\text{mol/ml}$) với mật độ quang (ΔOD_{540})

Các thông số tăng trưởng (tổng hàm lượng chlorophyll, chiều cao cây, hàm lượng tích lũy chất khô) được ghi nhận tại thời điểm 36 ngày sau gieo của cây đậu nành xử lý phun phức OC-Zn²⁺ với OC KLPT khác nhau như trình bày trên Bảng 3.6. Kết quả cho thấy, các nghiệm thức xử lý phun phức OC-Zn²⁺ thì thông số sinh trưởng cây đậu nành đều cao và khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng (phun nước), ngoại trừ phức OC-Zn²⁺ với OC KLPT 7,8 kDa.

Tuy nhiên, so sánh kết quả đó giữa các phức OC-Zn²⁺ thì thông số tăng trưởng gần như không khác biệt ý nghĩa. Kết quả này chứng tỏ rằng OC có KLPT trong khoảng 2,5 – 7,8 kDa, khi tạo phức với kẽm thì gần như không thay đổi hiệu quả kích thích tăng trưởng trên cây đậu nành. Điều này có thể xuất phát từ các lý do sau: thời gian khảo sát chưa đủ dài và tại nồng độ 50 ppm; phân đoạn OC KLPT thấp hiện diện trong dung dịch OC; hiệu quả của hiệu ứng đồng vận giữa Zn²⁺ với OC trong khoảng KLPT 2,5 – 7,8 kDa không khác biệt rõ ràng. Tuy nhiên, theo kết quả nghiên cứu của *Dzung và cộng sự* (2017) khi xử lý 50 ppm OC 2,5 kDa trên cây ớt cho kết quả về

sinh khối tươi, sinh khối khô có sự khác biệt thống kê so với OC 5,0 kDa và 7,8 kDa nhưng tổng hàm lượng chlorophyll thì không khác biệt [32]. Kết quả của [Luan và cộng sự](#) (2006) cho thấy chitosan chiếu xạ 100 kGy (KLPT trung bình 16 kDa) kích thích gia tăng sinh khối tươi của lúa đại mạch cao hơn các loại chitosan chiếu xạ 25, 50, 75 và 200 kGy nhưng hầu như sự khác biệt không đạt ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, nhóm tác giả này thực hiện tách phân đoạn KLPT của mẫu chitosan chiếu xạ 100 kGy, kết quả thử nghiệm trên cây đại mạch và cây đậu nành đã xác định khoảng KLPT OC < 3 kDa đã kích thích gia tăng sinh khối tươi đạt cao và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các loại phân đoạn KLPT lớn hơn [152].

Bảng 3.6: Tổng hàm lượng chlorophyll, chiều cao cây và hàm lượng tích lũy chất khô của cây đậu nành được xử lý phun các dung dịch phức oligochitosan-Zn²⁺ với OC KLPT khác nhau, cùng tỷ lệ phần mol 1/0,5 (tại thời điểm ngày thứ 36 sau gieo)

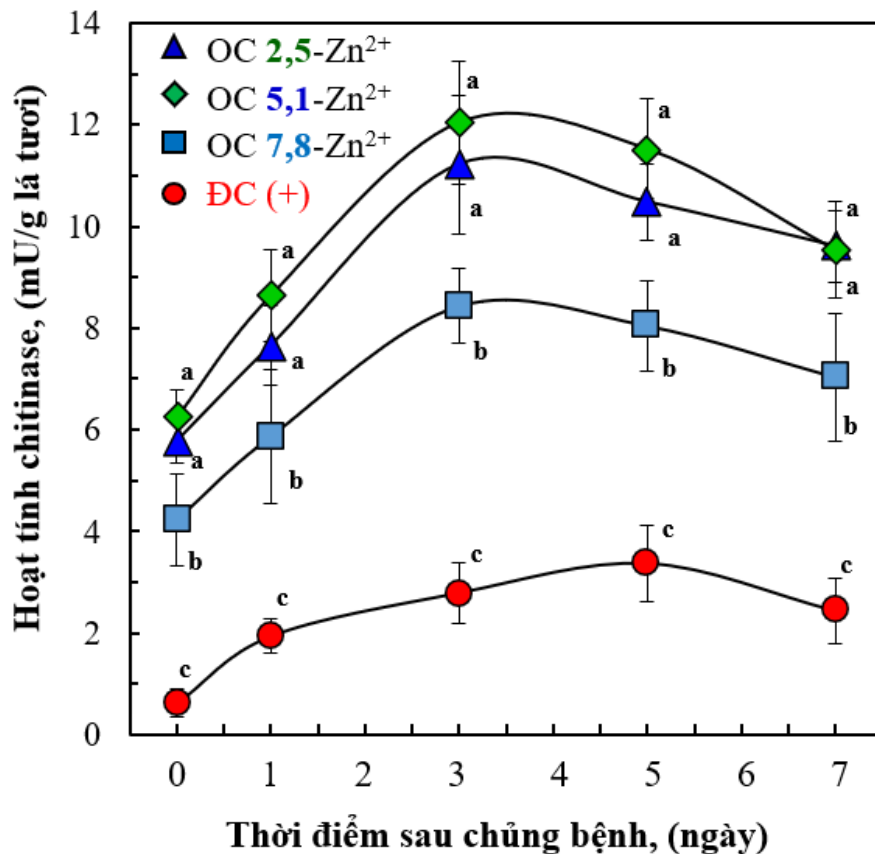
Nghiệm thức	Tổng chlorophyll, (mg/g lá tươi)	Chiều cao cây, (cm)	Hàm lượng chất khô, (g/cây)
ĐC (phun nước)	1,79 ^b ± 0,18	37,2 ^b ± 1,53	5,11 ^b ± 0,22
OC2,5-Zn ²⁺	2,53 ^a ± 0,31	43,8 ^a ± 2,75	5,77 ^a ± 0,33
OC5,1-Zn ²⁺	2,32 ^a ± 0,27	42,3 ^a ± 5,57	5,86 ^a ± 0,30
OC7,8-Zn ²⁺	2,15 ^{ab} ± 0,24	40,8 ^{ab} ± 2,75	5,42 ^{ab} ± 0,29
<i>CV%</i>	11,68	5,98	5,19
<i>LSD_{0,05}</i>	0,48	4,62	0,54

* Các giá trị trung bình trong cùng 1 cột mang ký tự giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê với mức xác suất tin cậy $p < 0,05$.

[Muley và cộng sự](#) (2019) cũng ghi nhận không có sự khác biệt về hàm lượng chlorophyll trên cây khoai tây giữa nghiệm thức xử lý chitosan và OC trong khoảng nồng độ 25 – 100 ppm [77]. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của [Zou và cộng sự](#) (2015) cũng cho thấy rằng ĐĐA của OC có ảnh hưởng đáng kể đến sinh trưởng và khả năng chống chịu mặn của cây lúa mì [66].

Cùng với hiệu ứng kích thích tăng trưởng của OC thì kẽm là một thành phần chính của các enzyme khác nhau như oxidoreductase, transferase và hydrolase,.. tham gia vào quá trình hình thành carbohydrate và diệp lục tố. Đồng thời kẽm cũng là một thành phần của protein ngón tay kẽm, được biết là liên kết với DNA và RNA để điều hòa gen trong quá trình sinh trưởng phát triển cây trồng [153]. Hiệu ứng gia tăng rõ rệt về kích thích tăng trưởng, tăng quang hợp, tăng hoạt tính enzyme kháng oxi hóa

trong cải bắp khi xử lý phun kẽm đã được Hajiboland và cộng sự (2010) minh chứng [154]. Công thức chitosan-Zn²⁺ đã được đánh giá về khả năng sinh trưởng và phát triển hiệu quả trên cây đậu [81]. Hơn thế nữa, khi xử lý phun kẽm và các phức chitosan-Zn²⁺ ngoài hiệu ứng kích thích tăng trưởng, kích kháng bệnh thì còn làm tăng tích lũy kẽm trong sản phẩm nông phẩm, điều này có ý nghĩa rất quan trọng là nguồn bổ sung kẽm cho vật nuôi và con người tiêu thụ [44, 113].



Hình 3.23: Hoạt tính chitinase tại các thời điểm (ngày) sau chủng bệnh trên cây đậu nành đã được xử lý phun các dung dịch phức oligochitosan-Zn²⁺ với OC có KLPT khác nhau, cùng tỷ lệ phần mol 1/0,5. Thanh sai số (error bar) biểu thị cho độ lệch chuẩn (standard deviation) của các giá trị trung bình với ít nhất 3 lần lặp; Các giá trị trên cùng 1 thời điểm có ký tự giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê với mức xác suất tin cậy $p < 0,05$.

Kết quả hiệu ứng kích tạo hoạt tính enzyme chitinase (CA) trên đậu nành theo thời gian sau khi phun nấm *C. truncatum* gây nhiễm bệnh của các phức OC-Zn²⁺ với OC có KLPT khác nhau được trình bày trong Hình 3.23. Kết quả cho thấy giá trị CA của cây đậu nành được xử lý bằng các phức OC-Zn²⁺ khác nhau đều cao hơn đáng kể so với nghiệm thức đối chứng + (phun nước – phun bệnh). Hơn nữa, trong số các phức khảo sát, thì phức OC5,1-Zn²⁺ và phức OC2,5-Zn²⁺ đã kích tạo CA đạt lần lượt là 12,04 và 11,22 mU/g lá tươi là cao hơn đáng kể so với CA của phức OC7,8-Zn²⁺ (8,43 mU/g lá tươi) và đối chứng + (2,79 mU/g lá tươi) vào ngày thứ 3 sau phun bệnh.

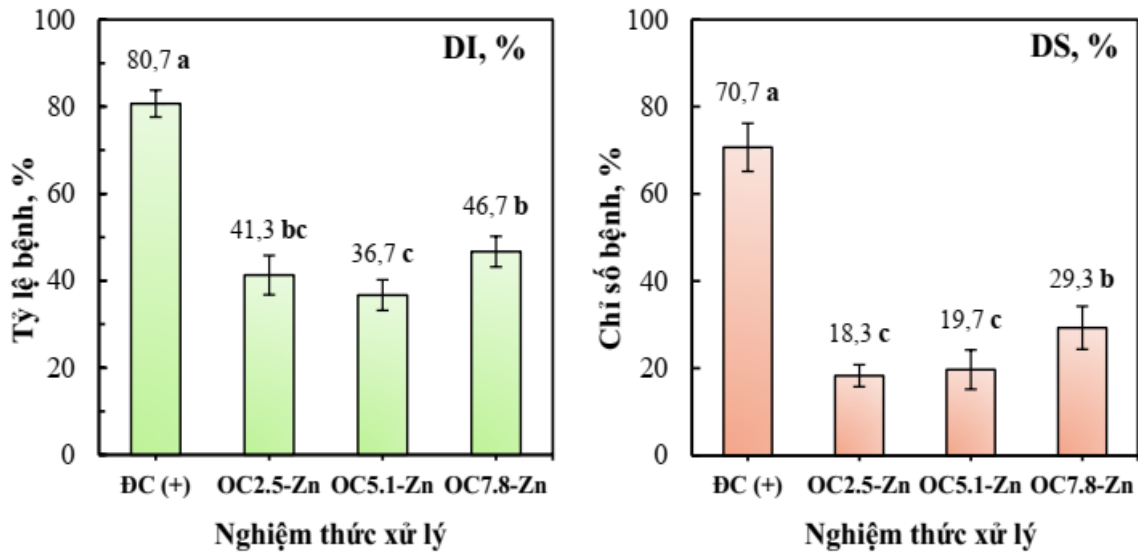
Qua kết quả thu được như trên, chứng tỏ rằng hiệu quả kích tạo chitinase trên đậu nành của phức OC-Zn²⁺ có sự phụ thuộc vào KLPT của OC. Cụ thể, KLPT của OC càng thấp thì hiệu ứng kích tạo CA càng cao. Kết quả của tác giả [Rodríguez và cộng sự](#) (2007) về hiệu ứng kích kháng bệnh đạo ôn (do nấm *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc.) trên cây lúa cũng minh chứng rằng hiệu quả kích tạo enzyme chitinase bởi OC cao và nhanh hơn so với chitosan [78]. Xu hướng tương tự cũng được ghi nhận đối với OC và phức OC-SiO₂ trên cây thanh long [87].

Tuy nhiên, kết quả ở [Hình 3.23](#) cho thấy hiệu ứng kích tạo chitinase trên cây đậu nành của phức OC_{5,1}-Zn²⁺ và phức OC_{2,5}-Zn²⁺ gần như không có sự khác biệt đáng kể, mặc dù KLPT của OC khác nhau. Nguyên do vẫn chưa được làm sáng tỏ. Tuy nhiên trong trường hợp này, có thể là do ảnh hưởng bởi sự khác biệt về độ deacetyl (ĐĐA) của OC, cụ thể là ĐĐA ~72% đối với OC 2,5 kDa so với ~87% của OC 5,1 kDa.

Theo kết quả nghiên cứu của [Younes và cộng sự](#) (2014), hiệu lực kháng nấm trong điều kiện *in vitro* của OC cũng phụ thuộc vào ĐĐA [155]. OC có ĐĐA cao thì chứa nhiều nhóm amin (-NH₂) hơn và sẽ làm tăng khả năng liên kết với Zn²⁺, đồng nghĩa làm tăng mật độ điện tích dương. Kết quả là làm tăng sự tương tác của OC-Zn²⁺ với các tế bào nấm, dẫn đến gây ức chế hoặc tiết trừ sự phát triển của nấm [37, 148]. Kết quả thu được về hiệu quả kích tạo enzyme chitinase gây ra trên đậu nành của phức OC_{5,1}-Zn²⁺ cũng tương tự như kết quả của phức OC-Cu²⁺ trên cây nho như đã được công bố bởi [Aziz và cộng sự](#) (2006). Mặc dù các tác giả chưa giải thích rõ ràng về cơ chế, nhưng kết quả thu được cho thấy rõ ràng là hiệu quả kích tạo enzyme chitinase chủ yếu phụ thuộc vào KLPT, ĐĐA và nồng độ của OC [56].

Hơn nữa, cần xem xét thêm sự khác biệt về cấu trúc của các OC có cùng ĐĐA nhưng khác nhau kiểu phân bố của các đơn vị D-glucosamine và N-acetyl-D-glucosamine trong phân tử OC [156]. Theo [Pusztahelyi](#) (2018) đã tóm tắt hiệu ứng kích thích phản vệ ở cây trồng bởi chitosan hoặc OC thông qua các hoạt động: thay đổi thông lượng ion, axit hóa tế bào chất, phân cực màng tế bào, phosphoryl hóa protein, kích tạo chitinase và glucanase, lignin hóa, tạo ROS, sinh tổng hợp jasmonic, tạo phytoalexin và hoạt hóa biểu hiện gen liên quan phản vệ, kích tạo chất ức chế proteinase của vi sinh vật, hình thành callose,... . Không giống như các tác nhân kích thích khác, dẫn xuất polysaccharide không gây phản ứng tăng mẫn cảm quá mức (hypersensitive reaction – có thể gây chết tế bào vào ký chủ), đồng thời chitosan hoặc OC kích hoạt đáp ứng phòng vệ mang tính hệ thống (systemic acquired resistance-SAR) và mức độ phụ thuộc chủ yếu vào ĐĐA và KLPT của chúng [157].

Hiệu quả kích tạo chitinase của phức OC-Zn²⁺ được xem là tín hiệu hệ thống phản vệ được kích hoạt làm gia tăng khả năng phòng trừ nấm bệnh cho cây đậu nành.



Hình 3.24: Tỷ lệ bệnh (DI%) và chỉ số bệnh (DS%) thán thư tại thời điểm 21 ngày sau chủng bệnh trên các cây đậu nành đã được xử phun các dung dịch phức oligochitosan-Zn²⁺ với OC KLPT khác nhau, cùng tỷ lệ phần mol 1/0,5

Các giá trị trên cùng 1 hình mang ký tự giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê với mức xác suất tin cậy $p < 0,05$.

Kết quả tỷ lệ bệnh (DI) và chỉ số bệnh (DS) của cây đậu nành được xử lý phun các dung dịch phức OC-Zn²⁺ với OC KLPT khác nhau (2,5 kDa; 5,1 kDa; và 7,8 kDa) như trình bày trên Hình 3.24. Các nghiệm thức xử lý với phức OC-Zn²⁺ đều thể hiện hiệu lực kiểm soát bệnh thán thư thông qua giá trị các chỉ số DI, DS thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng + (phun nước – phun nhiễm bệnh).

Hơn nữa, qua kết quả trên cho thấy các phức OC-Zn²⁺ với OC KLPT thấp thì hiệu quả kiểm soát bệnh thán thư tốt hơn so với OC KLPT cao. Cụ thể, giá trị DI chỉ từ 36,7% đến 41,3% và DS từ 18,3% đến 19,7% đối với nghiệm thức OC-Zn²⁺ có KLPT của OC 2,5 kDa và 5,1 kDa là thấp hơn so với trường hợp 7,8 kDa (DI 46,7% và DS 29,3%). Nguyên nhân sự khác nhau về hiệu lực ức chế bệnh của phức OC-Zn²⁺ từ OC KLPT khác nhau có thể được giải thích chủ yếu là do hiệu ứng tác động gián tiếp [45] với mức độ khác nhau xuất phát từ OC KLPT khác nhau. Hiệu quả kích kháng bệnh của phức OC-Zn²⁺ (liều xử lý 50 ppm) đạt được trong nghiên cứu này là cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Prapagdee và cộng sự (2007) về hiệu ứng kích kháng bệnh chết nhanh do nấm *Fusarium solani* f.sp. *glycines* gây ra trên cây đậu nành bởi chitosan KLPT 200 kDa. Để đạt được hiệu quả kháng bệnh và kích tạo chitinase đạt tối đa thì liều xử lý chitosan là 3 mg/ml (~3.000 ppm) [79].

Kết quả nghiên cứu của [Tuan và cộng sự](#) (2019) đã cho thấy OC với KLPT 3 kDa là hiệu quả nhất trong việc bảo vệ cây thanh long trước sự nhiễm nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm nâu (chỉ số bệnh đạt thấp nhất) và kích tạo cao nhất hoạt tính enzyme chitinase so với các mẫu OC có KLPT cao hơn là 5 kDa và 7 kDa [87]. Mặt khác, [Aziz và cộng sự](#) (2006) thông báo rằng xử lý phun OC với KLPT 1,5 kDa sẽ kích thích gây tạo mạnh nhất phytoalexin, enzyme glucanase và chitinase trong lá nho so với OC KLPT 3,0 kDa và 10 kDa [56].

Hiệu quả kích tạo các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp có hoạt tính kháng bệnh trong cây trồng bởi tác động của chitosan, OC được nhiều nghiên cứu xác nhận là phụ thuộc vào tính chất hóa lý, phương pháp áp dụng, đặc biệt là nồng độ xử lý, ĐĐA và KLPT. Kết quả nghiên cứu của [Falcón-Rodríguez và cộng sự](#) (2011) đã báo cáo rằng nồng độ OC cần thiết để kích tạo hoạt tính enzyme đạt mức tối đa thì thấp hơn 10 lần so với nồng độ chitosan. Lý do của sự khác biệt được cho là OC linh động có thể dễ dàng tiếp cận, vượt qua hệ thống ngăn cản vật lý, liên kết với thụ thể màng tế bào và thâm nhập vào nội bào thực vật hơn so với chitosan KLPT lớn [158].

[Yang và cộng sự](#) (2012) cũng đã công bố kết quả về hiệu quả kháng nấm *Monilinia fructicola* gây bệnh thối nâu trên quả đào của chitosan (360 kDa) và OC (6 kDa). Kết quả minh chứng OC hiệu quả cao hơn so với chitosan. Nhóm tác giả đã biện luận rằng, ngoài hiệu ứng ức chế nấm trực tiếp còn có cơ chế tác động gián tiếp chiếm ưu thế trong hiệu lực kiểm soát bệnh [115]. Hơn nữa, kết quả nghiên cứu của [Zahid và cộng sự](#) (2015) về hiệu quả kích kháng bệnh thán thư trên đậu nành bởi dung dịch vi nhũ chitosan cũng đã minh chứng rằng kích thước hạt vi nhũ 200 nm thể hiện hiệu ứng kích tạo hệ thống enzyme phản vệ kháng bệnh mạnh hơn so với kích thước hạt lớn hơn là 400 nm và 600 nm [112]. Do vậy, khi nghiên cứu hiệu lực phòng trừ bệnh cây trồng của phức chitosan hoặc OC với chất chelate thì thông số về KLPT và nồng độ luôn luôn ưu tiên khảo sát. Từ các quả thu được ở trên về hiệu ứng kích thích tăng trưởng, hiệu lực kích tạo chitinase kháng bệnh và mức độ kiểm soát bệnh thán thư, phức OC5,1-Zn²⁺ được lựa chọn để thực hiện các nội dung nghiên cứu tiếp theo.

3.4.2. Hiệu quả kích tạo chitinase, kích thích sinh trưởng và kiểm soát bệnh trên cây đậu nành của phức oligochitosan-Zn²⁺ theo nồng độ

Chitosan, OC đã được xác nhận là hoạt chất tự nhiên có hoạt tính dinh dưỡng sinh học (biofertilizer), trừ bệnh sinh học (biopesticide), kích thích sinh học (biostimulant). Chế phẩm chitosan hoặc OC thể hiện hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, kháng vi rút phổ rộng, hỗ trợ tích cực cho cây trồng chống lại bệnh hại hiệu quả và đồng thời chitosan, OC cũng thể hiện hiệu ứng kích thích tăng trưởng và năng suất

cây trồng. Hoạt tính của chúng có sự phụ thuộc vào cách thức áp dụng (bón gốc, phun lá,..) và nồng độ [77, 159, 160]. Hơn nữa, chitosan hoặc OC khi kết hợp với muối kẽm đã thể hiện hiệu ứng kích thích sinh học hiệu quả trên cây trồng theo kiểu phụ thuộc nồng độ [81, 160].

Kết quả tổng hàm lượng chlorophyll, chiều cao cây, hàm lượng tích lũy chất khô của cây đậu nành được xử lý phun lá dung dịch phức OC5,1-Zn²⁺ theo nồng độ khác nhau, tại thời điểm 36 ngày sau gieo như đã được trình bày trên [Bảng 3.7](#). Có thể thấy rằng, các thông số tăng trưởng của cây đậu nành ở các nghiệm thức có xử lý phun phức OC5,1-Zn²⁺ đều cao hơn so với nghiệm thức đối chứng (phun nước). Tuy nhiên, xử lý phun phức OC5,1-Zn²⁺ với nồng độ lớn hơn 50 ppm (tính theo nồng độ OC 5,1 kDa) thì các chỉ số trên đạt cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng. Mặc dù vậy, khi áp dụng phun phức OC5,1-Zn²⁺ với nồng độ 100 ppm thì các thông số tăng trưởng của cây đậu nành đạt được gần như không cao hơn so với nghiệm thức phun phức OC5,1-Zn²⁺ 50 ppm. Kết quả thu được như ở [Bảng 3.7](#), cũng chỉ ra rằng nồng độ xử lý phun lá dung dịch phức OC5,1-Zn²⁺ tại 50 ppm là phù hợp nhất trong các nghiệm thức khảo sát.

Bảng 3.7: Tổng hàm lượng chlorophyll, chiều cao cây và hàm lượng tích lũy chất khô của cây đậu nành được xử lý phun các dung dịch phức oligochitosan-Zn²⁺ tỷ lệ phần mol 1/0,5 theo nồng độ khác nhau (tại thời điểm ngày thứ 36 sau gieo)

Nghiệm thức	Tổng Chlorophyll, (mg/g lá tươi)	Chiều cao cây, (cm)	Hàm lượng chất khô, (g/cây)
ĐC (nước)	1,99 ^b ± 0,12	36,00 ^b ± 2,50	5,08 ^b ± 0,15
OC-Zn ²⁺ - 25ppm	2,15 ^{ab} ± 0,20	37,83 ^{ab} ± 2,52	5,82 ^{ab} ± 0,30
OC-Zn ²⁺ - 50ppm	2,31 ^a ± 0,15	41,17 ^a ± 1,53	6,46 ^a ± 0,60
OC-Zn ²⁺ - 100ppm	2,41 ^a ± 0,12	42,50 ^a ± 3,12	6,30 ^a ± 0,78
<i>CV%</i>	6,85	6,31	8,83
<i>LSD_{0,05}</i>	0,29	4,68	0,98

* Các giá trị trên cùng 1 cột có chứa ký tự giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê với mức xác suất tin cậy $p < 0,05$. Phức Oligochitosan 5,1 kDa – Zn²⁺, cùng tỷ lệ phần mol 1/0,5.

Kết quả nhận được cũng phù hợp với công bố của [Luan và cộng sự](#) (2006) về hiệu ứng kích thích tăng trưởng của OC cắt mạch bằng bức xạ trên lúa mì và cây đậu nành [152] và công bố của [Dzung](#) (2005) trên cây đậu nành và cây đậu phộng [161]. Ngoài ra, kết quả ảnh hưởng của nồng độ phun phức OC5,1-Zn²⁺ nhận được cũng có

xu hướng tương tự như báo cáo của [Palacio-Márquez và cộng sự](#) (2021), khi phun dung dịch chitosan-Zn²⁺ nồng độ 50 ppm cho hiệu ứng tăng trưởng, năng suất trên đậu cô ve đạt tốt nhất [162]. Phun dung dịch chitosan-Zn²⁺ làm gia tăng hiệu quả sinh khối, hiệu suất quang hợp và độ dẫn khí khổng, enzyme chuyển hóa đạm nitrate reductase, sản lượng, chlorophyll, hàm lượng amino axit và protein trong cây đậu.

Hiệu ứng kích thích tăng trưởng cây đậu nành của phức OC5,1-Zn²⁺ đạt được gần như đều cao hơn khi so sánh với kết quả xử lý cobalt nano của nhóm tác giả [Hong và cộng sự](#) (2019) [130]. Nguyên nhân có thể là do vai trò quan trọng của kẽm trong hoạt động sinh lý – sinh hóa đối với cây trồng, đồng thời cả muối kẽm nitrate và OC còn được xem là nguồn cung cấp đạm bổ sung cho cây trồng [162].

Hiệu quả kích thích tăng trưởng cây trồng thông qua khả năng cải thiện các quá trình sinh lý sinh hóa của kẽm [154] và chitosan hoặc OC đã được nghiên cứu chi tiết và được thừa nhận trước đây [74, 163]. Khi xử lý cây trồng ở nồng độ thích hợp thì kẽm, OC kích thích gia tăng hiệu suất quang hợp, cân bằng hormone, tăng phiên mã mRNA, kích thích tăng sinh tổng hợp protein và đường, tăng tổng hợp enzyme kháng oxi hóa, kháng bệnh, tăng khả năng cố định đạm [164].

Gần đây, [Patel và cộng sự](#) (2020) đã công bố kết quả xử lý phức chitosan-ZnO nano trên cụm mô chồi (callus) cây thuốc lá cho thấy hiệu ứng của phức làm gia tăng các chỉ tiêu sinh trưởng và tăng khả năng chống chịu với điều kiện gây hại cho callus, nhờ vào hiệu ứng cung cấp nguồn đạm bổ sung, giảm tốc độ thoát hơi nước, tăng khả năng hấp thu nước và dưỡng chất, kích hoạt hệ enzyme kháng oxi hóa, và đặc biệt là dạng phức làm tăng hiệu quả sử dụng kẽm, duy trì hiệu ứng do tính năng ly giải kẽm thích hợp [119]. Tuy nhiên, khi sử dụng nồng độ cao thì có khả năng gây ức chế sự sinh trưởng phát triển và gây hại cho cây trồng do có thể phá vỡ cân bằng nội môi [112, 153, 165, 166] và kích tạo quá mức các tác nhân oxi hóa mạnh (ROS) [119].

Ngoài hiệu ứng kích thích gia tăng các chỉ số tăng trưởng, phun phức OC5,1-Zn²⁺ còn thể hiện hiệu quả kích tạo hoạt tính enzyme chitinase trên cây nành theo kiểu phụ thuộc nồng độ ([Bảng 3.8](#)). Kết quả nhận được cho thấy rằng hoạt tính chitinase trong cây đậu nành ở các nghiệm thức xử lý với phức OC5,1-Zn²⁺ đều cao hơn và khác biệt thống kê so với nghiệm thức đối chứng +. Tuy nhiên, nghiệm thức xử lý phức OC5,1-Zn²⁺ ở nồng độ thấp (25 ppm) thì thời gian kích tạo chitinase đạt giá trị tối đa (CA~8,7 mU/g lá tươi) là 5 ngày (tính từ thời điểm phun chủng bệnh). Trong khi đó, các nghiệm thức xử lý phun OC5,1-Zn²⁺ với nồng độ cao hơn (50 ppm và 100 ppm) thì thời gian kích tạo chitinase đạt tối đa (trung ứng là CA~13,2 và 14,3 mU/g lá tươi) tại ngày thứ 3 sau phun chủng bệnh. Hơn nữa, quan sát kết quả hiệu

lực kích tạo chitinase giữa nghiệm thức phun OC5,1-Zn²⁺ 50 ppm và nghiệm thức phun OC5,1-Zn²⁺ 100 ppm thì giá trị CA không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.8: Hoạt tính chitinase (mU/g lá tươi) tại các thời điểm (ngày) sau chủng bệnh trên cây đậu nành đã được xử phun các dung dịch phức oligochitosan-Zn²⁺ với OC 5,1 kDa, tỷ lệ phần mol 1/0,5 theo nồng độ khác nhau (tính trên cơ sở nồng độ của OC)

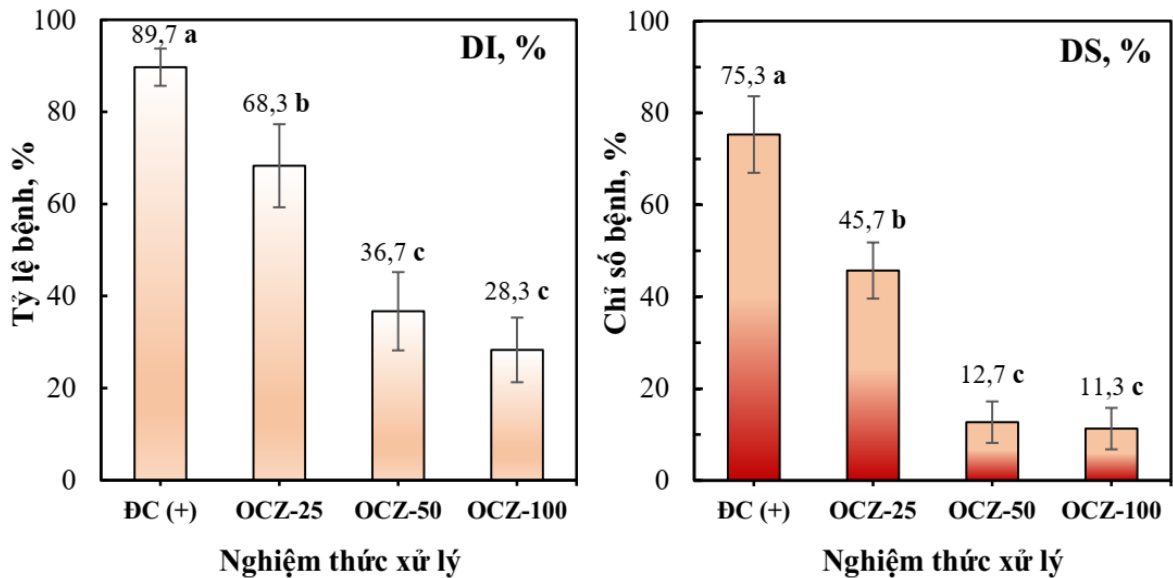
Nghiệm thức	0 ngày	1 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày
ĐC (nước)	0,59 ^c ± 0,05	0,66 ^c ± 0,09	0,72 ^c ± 0,10	0,55 ^d ± 0,08	0,69 ^d ± 0,07
ĐC (+)	0,63 ^c ± 0,10	1,82 ^c ± 0,52	2,11 ^c ± 0,35	3,42 ^c ± 0,54	2,64 ^c ± 0,60
OC-Zn ²⁺ -25ppm	4,14 ^b ± 0,85	5,93 ^b ± 0,86	8,08 ^b ± 1,02	8,69 ^b ± 0,62	7,67 ^b ± 0,74
OC-Zn ²⁺ -50ppm	6,25 ^a ± 0,78	8,73 ^a ± 1,50	13,16 ^a ± 1,04	11,22 ^a ± 0,88	9,57 ^a ± 0,92
OC-Zn ²⁺ -100ppm	6,11 ^a ± 0,91	8,95 ^a ± 0,95	14,33 ^a ± 0,94	10,51 ^a ± 1,08	10,81 ^a ± 0,95
CV%	18,60	17,50	10,270	10,54	11,60
LSD _{0,05}	1,20	1,66	1,44	1,32	1,32

* Các giá trị trên cùng 1 thời điểm có chứa 1 ký tự giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê với mức xác suất tin cậy $p < 0,05$. ĐC (+): Phun nước – phun bệnh; OC-Zn²⁺: Phức oligochitosan 5,1 kDa – Zn²⁺. Nồng độ tính trên cơ sở nồng độ của OC 5,1 kDa.

Kết quả thu nhận được như trên **Bảng 3.8** chứng tỏ rằng khi xử lý phun cây đậu nành với phức OC5,1-Zn²⁺ nồng độ 50 ppm là thích hợp (hoạt lực kích tạo chitinase cao và đáp ứng nhanh). Kết quả ảnh hưởng của nồng độ phức OC5,1-Zn²⁺ đến hiệu quả kích tạo enzyme chitinase trên cây đậu nành cũng có xu hướng tương tự như kết quả được công bố bởi **Adamuchio-Oliveira và cộng sự** (2020) về nghiên cứu hiệu ứng kích tạo enzyme kháng bệnh (chitinase, glucanase) trên cây cà chua của phức chitosan-Cu²⁺ chelate. Nhóm tác giả này cũng ghi nhận xử lý phức chitosan-Cu²⁺ chelate với nồng độ chitosan ~50 ppm và Cu²⁺ chelate 150 ppm - 200 ppm thì gia tăng mức độ sinh trưởng, phát triển và khả năng kích hoạt hệ thống phòng vệ, tăng hoạt tính chitinase, đồng thời ức chế hiệu quả mức độ nhiễm bệnh phấn trắng do nấm *Leveillula taurica* gây ra trên cây cà chua [121].

Hiệu quả ức chế bệnh thán thư trên cây đậu nành được xử lý phun phức OC5,1-Zn²⁺ với nồng độ khác nhau tại thời điểm 21 ngày sau chủng bệnh như trình bày trên **Hình 3.25**. Kết quả cho thấy rằng, hiệu quả kiểm soát bệnh thán thư có sự phụ thuộc vào nồng độ của phức OC5,1-Zn²⁺. Nồng độ càng cao, hiệu quả ức chế bệnh càng

cao. Cụ thể, tỷ lệ bệnh DI 68,3%; 36,7%; 28,3% và chỉ số bệnh DS 45,7%; 12,7%; 11,3% tương ứng đối với nồng độ phun phức OC5,1-Zn²⁺ là 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm; kết quả này đều thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng + (DI 89,7% và DS 75,3%). Tuy nhiên, so sánh kết quả ức chế bệnh thán thư giữa 2 nghiệm thức xử lý phun phức OC5,1-Zn²⁺ 50 ppm và 100 ppm thì các giá trị thu được không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê. Giá trị DI và DS của 2 nghiệm thức này giảm tương ứng 59 – 69%; và 83 – 85% so với đối chứng +.



Hình 3.25: Tỷ lệ bệnh (DI%) và chỉ số bệnh (DS%) thán thư tại thời điểm 21 ngày sau chủng bệnh trên các cây đậu nành đã được xử phun các dung dịch phức oligochitosan-Zn²⁺ với nồng độ khác nhau (OC 5,1 kDa - Zn²⁺, tỷ lệ phần mol 1/0,5) ĐC (+): Phun nước – phun bệnh; OCZ-25, -50, -100: tương ứng là phức OC5,1-Zn²⁺ với nồng độ 25ppm, 50ppm, và 100ppm. Các giá trị trên cùng 1 hình mang ký tự giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê với mức xác suất tin cậy $p < 0,05$.

Từ kết quả này có thể thấy rằng, xử lý phun phức OC5,1-Zn²⁺ nồng độ 50 ppm là thích hợp cả về mặt sinh trưởng phát triển và khả năng phòng trừ bệnh thán thư cho cây đậu nành.

Kết quả nhận được cũng tương tự như công bố của *Dzung và cộng sự* (2017) [32] và *Thuy và cộng sự* (2017) [85] về hiệu lực kiểm soát bệnh thán thư trên cây ớt của phức OC-nSiO₂. Cho đến nay, cơ chế ức nấm bệnh trên cây trồng của phức OC5,1-Zn²⁺ vẫn chưa được giải thích đầy đủ. Tuy nhiên, hiệu lực phòng trừ nấm bệnh của chitosan hoặc OC chiếu xạ được gia tăng đáng kể khi kết hợp với kẽm ở dạng phức [37, 110]. Cơ chế kháng nấm bệnh của chitosan hoặc OC và kẽm đã được lý giải theo hai cách: tác động trực tiếp (tương tác và gây độc trực tiếp tế bào nấm bệnh,

ngăn cản sự tiếp xúc của mầm bệnh với tế bào thực vật) và gián tiếp (kích hoạt hệ thống phòng vệ của cây trồng bao gồm tăng sinh tổng hợp các enzyme phân giải mầm bệnh như glucanase, chitinase) [47, 55, 153]. Mức độ kích kháng bệnh của chitosan, OC và dạng phức với kim loại cũng đã được công nhận là có sự phụ thuộc vào KLPT của chúng và nồng độ sử dụng. Để làm rõ hơn về mức độ tác động của phức OC với Zn^{2+} , các kết quả liên quan được trình bày trong nội dung nghiên cứu tiếp sau.

3.4.3. Hiệu quả tác động kích tạo chitinase, kích thích sinh trưởng và kiểm soát bệnh trên cây đậu nành của phức oligochitosan- Zn^{2+} so với OC và Zn^{2+}

Trước khi phun nấm bệnh (tại ngày thứ 36 sau gieo hạt hay 01 ngày sau phun chất thử nghiệm lần thứ 03) để khảo sát hiệu ứng kích tạo chitinase, tiến hành lấy mẫu đo một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây đậu nành.

Bảng 3.9: Tổng hàm lượng chlorophyll, chiều cao cây và hàm lượng tích lũy chất khô của cây đậu nành được xử lý phun các dung dịch OC 5,1 kDa; phức oligochitosan- Zn^{2+} tỷ lệ mol 1/0,5; và Zn^{2+} (tại thời điểm ngày thứ 36 sau gieo)

Nghiệm thức	Tổng chlorophyll, (mg/g lá tươi)	Chiều cao cây, (cm)	Hàm lượng chất khô, (g/cây)
ĐC (phun nước)	1,84 ^b ± 0,15	34,7 ^b ± 2,25	4,96 ^b ± 0,20
Zn^{2+}	1,89 ^b ± 0,13	35,8 ^b ± 2,75	5,12 ^b ± 0,36
OC 5,1	2,03 ^{ab} ± 0,20	38,5 ^{ab} ± 3,77	5,34 ^{ab} ± 0,56
OC 5,1- Zn^{2+}	2,26 ^a ± 0,11	42,3 ^a ± 1,26	5,96 ^a ± 0,31
CV%	7,57	7,06	7,05
LSD _{0,05}	0,29	5,23	0,71

* Các giá trị trung bình trong cùng 1 cột mang ký tự giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê với mức xác suất tin cậy $p < 0,05$. Nồng độ phun: OC5,1 - 50 ppm; Zn^{2+} - 8,75 ppm; OC5,1- Zn^{2+} - (50 ppm OC + 8,75 ppm Zn^{2+}).

Kết quả **Bảng 3.9** và **Hình 3.26** cho thấy rằng cây đậu nành ở nghiệm thức xử lý phun phức OC5,1- Zn^{2+} tại nồng độ 50 ppm (tính theo nồng độ OC) có hàm lượng chlorophyll, chiều cao cây, và hàm lượng tích lũy chất khô đạt cao nhất trong các nghiệm thức khảo sát. Cụ thể, hàm lượng chlorophyll tổng số đạt 2,26 mg/g lá tươi, chiều cao cây đạt 42,3 cm, và hàm lượng chất khô đạt 5,96 g/cây là cao hơn có nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng (phun nước) và nghiệm thức phun kẽm (nồng độ phun 8,75 ppm Zn^{2+}). Tuy nhiên, các kết quả đạt được ở nghiệm thức phun phức

OC5,1-Zn²⁺ thì không có khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức OC 5,1 kDa tại thời điểm khảo sát. So sánh các thông số trên cũng cho thấy rằng các kết quả thu được ở nghiệm thức phun OC 5,1 kDa không đủ khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức phun kẽm. Từ các kết quả nhận được như trên, có thể thấy rằng ở nồng độ Zn²⁺ ~8,75 ppm gần như không thể hiện hiệu quả kích thích sinh trưởng phát triển cây đậu nành. Tuy nhiên khi kẽm kết hợp với OC trong dạng phức OC-Zn²⁺ thì hiệu ứng kích thích tăng trưởng được tăng lên đáng kể.



Hình 3.26: Cây đậu nành tại thời điểm ngày thứ 36 sau gieo được phun các dung dịch OC 5,1 kDa; phức oligochitosan-Zn²⁺ (tỷ lệ phân mol 1/0,5); và Zn²⁺

Kết quả nhận được tương tự như công trình nghiên cứu của [Palacio-Márquez và cộng sự](#) (2021). Nhóm tác giả nghiên cứu phun qua lá cây đậu cô ve (*Phaseolus vulgaris* L.), kết quả hiệu quả tăng trưởng tốt nhất đối với muối kẽm nitrate là 50 ppm Zn²⁺, nhưng khi kết hợp muối kẽm với chitosan thì hàm lượng Zn²⁺ chỉ cần 25 ppm là đạt hiệu quả cao tương tự [162]. Do vậy, sự kết hợp Zn²⁺ với OC hoặc chitosan ở dạng phức chelate có ý nghĩa lớn, không chỉ tăng cường và kéo dài hoạt tính sinh học cho OC và hoặc là chitosan mà còn góp phần giảm liều sử dụng và hạn chế lãng phí nguyên tố kẽm vi lượng [53].

Thực vật có khả năng kích hoạt hệ thống phòng vệ của chúng chống lại mầm bệnh và những tác động bất lợi (stress), trong đó bao gồm cả việc kích tạo và tích lũy enzyme chitinase khi bị mầm bệnh tấn công. Chitinase là một trong những nhân tố quan trọng trong hệ thống bảo vệ của thực vật do khả năng làm phân hủy cấu trúc

màng của tế bào vi sinh vật [57]. Bên cạnh đó, phản ứng kích tạo và gia tăng hoạt tính enzyme chitinase trong thực vật có thể được tạo ra bởi các tác nhân phi sinh học (abiotic agent) như axit salicylic, muối, ozone, kim loại,.. và các tác nhân sinh học (biotic agent) như vi sinh vật và oligosaccharide [151]. Hiệu quả kích kháng bệnh thán thư trên cây đậu nành thông qua đánh hoạt tính kích tạo enzyme chitinase của phức OC-Zn²⁺ được trình bày như sau:

Bảng 3.10: Hoạt tính chitinase (mU/g lá tươi) tại các thời điểm (ngày) sau chủng bệnh trên các cây đậu nành đã được xử lý phun các dung dịch OC 5,1 kDa; phức oligochitosan-Zn²⁺ với tỷ lệ phân mol 1/0,5; và Zn²⁺.

Nghiệm thức	0 ngày	1 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày
ĐC (nước)	0,65 ^d ± 0,10	0,76 ^d ± 0,08	0,74 ^e ± 0,12	0,63 ^d ± 0,11	0,67 ^d ± 0,15
ĐC (+)	0,67 ^d ± 0,09	1,94 ^c ± 0,25	2,73 ^d ± 0,36	3,18 ^c ± 0,38	2,51 ^c ± 0,29
Zn ²⁺	2,29 ^c ± 0,54	2,65 ^c ± 0,56	3,94 ^{cd} ± 0,74	3,69 ^c ± 0,51	2,31 ^c ± 0,32
OC 5,1 kDa	3,85 ^b ± 0,23	5,38 ^b ± 0,65	6,69 ^b ± 1,07	5,79 ^b ± 0,67	5,67 ^b ± 1,09
OC5,1-Zn ²⁺	6,31 ^a ± 1,54	8,79 ^a ± 1,43	11,56 ^a ± 1,12	10,59 ^a ± 0,95	9,77 ^a ± 1,03
CV%	16,74	15,14	13,98	12,43	14,07
LSD _{0,05}	0,84	1,08	1,18	1,08	1,07

* Các giá trị trên cùng 1 thời điểm có ký tự giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê với mức xác suất tin cậy $p < 0,05$. Mẫu ĐC (+): Phun nước – phun bệnh.

Các kết quả trong **Bảng 3.10** cho thấy cây đậu nành (đối chứng-chỉ phun nước) có hoạt tính chitinase (CA) đạt ~0,7 mU/g lá tươi, giá trị này gần như tương tự với CA của mô sẹo đậu nành được nuôi cấy trong môi trường thạch Murashige-Skoog, theo báo cáo của **Hirano và cộng sự** (2001) [80]. Sau khi chủng nấm *C. truncatum* để gây bệnh thán thư, CA của cây đậu nành (đối chứng +) tăng lên và đạt giá trị cao nhất ~3,18 mU/g lá tươi vào ngày thứ 5. Mức độ kích tạo chitinase trên cây đậu nành (đối chứng +) sau khi gây nhiễm nấm *C. truncatum* là gần giống với trường hợp gây nhiễm nấm *Fusarium solani* gây hội chứng chết nhanh trên cây đậu nành [79]. **Gupta và cộng sự** (2017) cũng ghi nhận hoạt tính enzyme chitinase trên cải xoăn (*Eruca sativa*) tăng lên và đạt tối đa sau ~2 ngày chủng nấm bệnh *Alternaria brassicicola* [167].

Giá trị CA ở các cây đậu nành sau phun OC 5,1 kDa (OC5,1), Zn²⁺ và phức OC5,1-Zn²⁺ lần thứ 3 cao hơn đáng kể so với mẫu đối chứng (phun nước). Cụ thể, ngay trước khi phun mầm bệnh (0 ngày), giá trị CA ở cây được xử lý bằng Zn²⁺, OC

5,1 kDa, và phức OC5,1-Zn²⁺ đạt lần lượt là 2,29; 3,85; và 6,31 mU/g lá tươi, tăng tương ứng là 3,52; 5,92; và 9,71 lần so với cây đối chứng (0,65 mU/g). Đến ngày thứ 3 sau khi phun mầm bệnh, CA của các cây đậu nành được xử lý với Zn²⁺, OC 5,1 kDa, và phức OC5,1-Zn²⁺ đạt giá trị cao nhất lần lượt là 3,94; 6,96; và 11,56 mU/g lá tươi so với 2,73 mU/g lá tươi của mẫu đối chứng + (phun nước – phun nhiễm bệnh).

Kết quả nhận được cũng cho thấy rằng kẽm thể hiện hiệu ứng kích kháng bệnh trên cây đậu nành thông qua giá trị CA tăng cao hơn so với các cây đối chứng. Hiệu ứng kích tạo enzyme liên quan đến phòng vệ trên cây trồng (Superoxide Dismutase - SOD, Phenylalanine ammonia lyase - PAL) và kháng thể thực vật (phytoalexin) như camalexin (là một alkaloid indole được tìm thấy trong cây họ cải, chất chuyển hóa thứ cấp có chức năng ngăn chặn vi khuẩn vật gây bệnh) của kẽm đã được xác nhận [55]. Ngoài ra, sự tích tụ kẽm ở lá với nồng độ < 300 mg/kg cũng đã được ghi nhận là gây độc trực tiếp cho vi sinh vật gây bệnh nhưng không gây độc cho cây trồng [53].

Kết quả trên [Bảng 3.10](#) cũng cho thấy OC KLPT 5,1 kDa thể hiện hiệu ứng kích tạo enzyme chitinase hiệu quả hơn so với kẽm. Hiệu quả kích tạo enzyme kháng bệnh trên cây trồng bởi OC đã được nhiều công trình nghiên cứu minh chứng [77, 150, 152]. Hiệu ứng kích kháng của OC chủ yếu liên quan đến khả năng kích thích hệ miễn dịch tự nhiên của thực vật và tăng sức đề kháng của thực vật đối với tác động bất lợi (stress). Điều này có liên quan đến nhiều loại thay đổi sinh lý và sinh hóa trong cây trồng. Chẳng hạn như đáp ứng với tác nhân oxi hóa: kích hoạt tích tụ H₂O₂, tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp (hợp chất polyphenolic, phytoalexin, flavonoid, alkaloid), tổng hợp enzyme phân giải mầm bệnh (chitinase, glucanase, protease) và chất ức chế tăng trưởng (axít abscisic, axít jasmonic, axít salicylic); và tích lũy lignin và callose. Tác dụng của OC đối với thực vật được phản ánh trong những thay đổi trong cấu trúc chromatin, ức chế hoạt động H⁺-ATPase trong màng tế bào, kích hoạt MAP kinase và tăng nồng độ Ca²⁺ trong tế bào [5, 51].

Ngoài ra, kết quả trên [Bảng 3.10](#) cũng cho thấy CA được kích tạo bởi phức OC5,1-Zn²⁺ trên cây đậu nành (11,56 mU/g lá tươi) đạt cao hơn so với tổng giá trị CA (10,63 mU/g lá tươi) của các mẫu xử lý OC 5,1 kDa (6,69 mU/g lá tươi) và Zn²⁺ (3,94 mU/g lá tươi). Kết quả này chỉ ra rằng phức OC5,1-Zn²⁺ đã thể hiện hiệu ứng đồng vận (synergistic effect) kích tạo CA làm tăng khả năng kháng bệnh thán thư. Hiệu quả kích tạo enzyme chitinase trên cây đậu nành cao bởi phức OC5,1-Zn²⁺ có thể là do tác động đồng thời và tăng cường hiệu quả cho nhau giữa OC và Zn²⁺.

Theo [Mejía-Teniente và cộng sự](#) (2010), OC thuộc về chất kích thích sinh học ngoại sinh (exogenously biogenic elicitor), còn Zn²⁺ thuộc về chất kích thích phi sinh

học (abiogenic elicitor), và cả hai đều có thể gây ra phản ứng phòng vệ của thực vật [168]. Hiệu ứng đồng vận kích kháng bệnh thán thư (kích tạo enzyme chitinase) của phức OC-Zn²⁺ có thể được giải thích như sau:

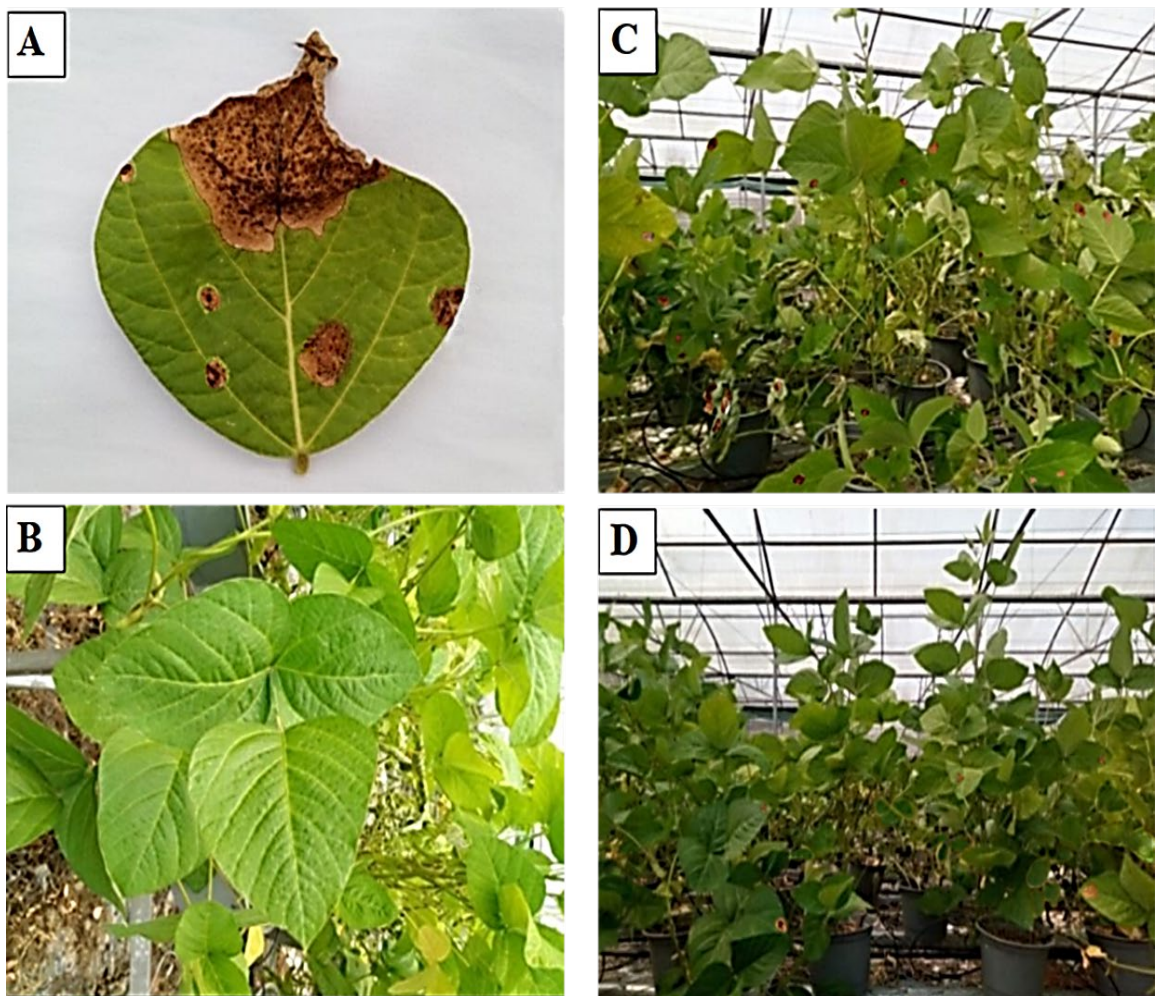
Đầu tiên, các nhóm amin (-NH₂) tích điện dương của các phân tử OC tương tác với các thành phần bề mặt tích điện âm của tế bào nấm, dẫn đến những thay đổi lớn về tính chất bề mặt tế bào, làm rò rỉ chất nội bào, và cuối cùng là gây chết tế bào nấm. Sau đó, các mảnh vỡ từ các tế bào nấm bị phân hủy sẽ hoạt động như nguồn tín hiệu (kháng nguyên) gây kích hoạt hệ thống phòng vệ của cây trồng. Mặt khác, các nhóm acetyl (-NHCOCH₃) trên phân tử OC có ái lực cao với một số protein thụ thể (receptor) trên màng tế bào thực vật (điển hình là CEBiP ở cây lúa). Và một khi các tương tác được thiết lập, nó tạo ra dòng thác các tín hiệu kích hoạt hệ thống miễn dịch của thực vật và kích tạo ra enzyme chitinase [169].

Thứ hai, Zn²⁺ đã được coi là chất kích kháng nấm cho thực vật do tác dụng gây độc trực tiếp đối với tế bào nấm bệnh và tác động gián tiếp thông qua kích hoạt các con đường điều hòa và sinh tổng hợp của hệ thống phản vệ của thực vật [55].

Kết quả thu được về tác động đồng vận kích tạo enzyme chitinase trên đậu nành của phức OC_{5,1}-Zn²⁺ tương tự như kết quả của hỗn hợp OC-Cu²⁺ trên cây nho [56] và phức chitosan-Cu²⁺ trên cây dưa chuột [151]. Các tác giả này cũng nhận định rằng: mặc dù chỉ riêng chitosan hoặc OC đã có tác dụng kích kháng nhưng khi tạo phức với đồng thì cho phép giảm liều lượng sử dụng để bảo vệ thực vật. Hiệu ứng đồng vận bao gồm *i*) hiệu quả của phức tốt hơn so với chitosan hoặc OC riêng rẽ, *ii*) đồng (Cu²⁺) tăng cường tác dụng kích thích trực tiếp của chitosan. Ngoài ra, đặc tính bám dính của chitosan trên lá có lẽ góp phần cố định và ly giải đồng ổn định trên lá trong thời gian tiếp xúc lâu hơn hay hiệu ứng được kéo dài.

Gần đây hơn, Tuan và cộng sự (2019) công bố kết quả về hiệu lực kháng bệnh đốm nâu trên cây thanh long được đánh giá bằng cách đo hoạt tính enzyme chitinase và mức độ bệnh sau khi phun OC 3,0 kDa, nSiO₂, phức nSiO₂-OC_{3,0} và gây nhiễm nấm bệnh đốm nâu *Neoscytalidium dimidiatum* [87]. Kết quả cho thấy sau 120 giờ gây nhiễm trở đi, phức nSiO₂-OC cũng thể hiện tác dụng đồng vận (CA đạt ~6,32 mU/g mô tươi) với hiệu quả cao hơn so với OC hoặc nSiO₂ riêng rẽ. So với kết quả này, thì phức OC-Zn²⁺ trên cây đậu nành đạt (CA ~11,56 mU/g lá tươi) cao hơn so với phức nSiO₂-OC. Nguyên nhân có thể do khác nhau về thành phần tạo phức và về loại cây (cây thanh long có lớp sáp và lớp vỏ cutin dày nên hạn chế tiếp xúc). Hiệu ứng kích tạo chitinase của phức OC-Zn²⁺ trên cây đậu nành đạt mức cao đã góp phần tích cực giúp cây kháng hiệu quả bệnh thán thư do nấm *C. truncatum* gây ra.

Như được biết, đa số giống cây đậu nành mẫn cảm với nấm *C. truncatum* ở tất cả các giai đoạn sinh trưởng phát triển, đặc biệt là từ khi nở hoa đến khi đậu quả. Triệu chứng rõ nét nhất xuất hiện trên tán lá là các mảng màu nâu với tâm màu xám ở mặt trên và màu như vết cháy sém ở mặt dưới lá. Bệnh gây thiệt hại đáng kể do làm giảm thể vững của cây, giảm chất lượng hạt giống, giảm khả năng nảy mầm và giảm năng suất. Các triệu chứng trên lá bao gồm hoại tử gân lá, cuống lá, thối cuống lá và rụng lá sớm. Tuy nhiên, giai đoạn bệnh trên quả là gây hại nặng nhất. Triệu chứng của bệnh thường xuất hiện ở giai đoạn sinh sản sớm trên thân, vỏ quả và cuống lá là các vết bệnh màu nâu sẫm, lõm và có hình dạng không đều. Các triệu chứng có thể tiến triển thành bệnh thối quả, rụng quả non và giảm hạt chắc [63, 65].



Hình 3.27: Biểu hiện bệnh thán thư trên cây đậu nành sau 07 ngày chủng nấm *C. truncatum*. A) Biểu hiện lá bị bệnh; B) ĐC (phun nước); C) ĐC (+) phun nước – phun bệnh; D: Phun phức OC5,1-Zn²⁺ và phun bệnh

Kết quả [Hình 3.27](#) cho thấy rằng sau 07 ngày phun bệnh, các cây đậu nành nghiệm thức đối chứng + (phun nước – phun bệnh) đã xuất hiện triệu chứng bệnh rõ ràng thông qua các đốm nâu sẫm phân bố trên các bề mặt lá. Trong khi đó, các dấu

hiệu của bệnh thán thư gần như không đáng kể trên các cây đậu nành ở nghiệm thức xử lý phun phức OC-Zn²⁺. Điều này chứng tỏ, cây đậu nành thí nghiệm nhạy với chủng nấm *C. truncatum*; và phức OC-Zn²⁺ có hiệu ứng kích kháng và phòng trừ bệnh thán thư hiệu quả trên cây đậu nành.

Bảng 3.11: Tỷ lệ bệnh (DI%) và chỉ số bệnh (DS%) thán thư tại thời điểm 21 ngày sau chủng bệnh trên các cây đậu nành đã được xử phun các dung dịch OC 5,1 kDa; phức oligochitosan-Zn²⁺ tỷ lệ phần mol 1/0,5; và Zn²⁺

Nghiệm thức	Tỷ lệ bệnh (DI, %)	Chỉ số bệnh (DS, %)
ĐC (nước)	KPH	KPH
ĐC (+)	91,33 ^a ± 4,73	79,67 ^a ± 8,50
Zn ²⁺	88,67 ^a ± 4,73	74,33 ^a ± 6,66
OC 5,1	63,67 ^b ± 10,02	47,67 ^b ± 9,02
OC 5,1-Zn ²⁺	38,67 ^c ± 7,02	17,67 ^c ± 3,79
<i>CV%</i>	9,88	13,29
<i>LSD_{0,05}</i>	13,12	13,72

* Các giá trị trên cùng 1 cột có ký tự giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê với mức xác suất tin cậy $p < 0,05$. KPH: Không phát hiện. Mẫu ĐC (+): Phun nước – phun bệnh.

Tại thời điểm 3 tuần sau phun nhiễm bệnh (thời điểm 56 – 57 ngày sau gieo – cây đang ở giai đoạn hoa nở rộ), tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh thán thư trên cây đậu nành ở các nghiệm thức được xác định và trình bày trên [Bảng 3.11](#). Kết quả nhận được cho thấy, nghiệm thức xử lý phun dung dịch muối kẽm nitrate với nồng độ 8,75 ppm Zn²⁺ thì tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh có xu hướng giảm nhưng không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng + (phun nước – phun bệnh). Nguyên nhân có thể ở nồng độ Zn²⁺ thấp không đủ gây độc trực tiếp cho tế bào nấm cũng như lượng enzyme chitinase kích tạo được và mức tích lũy không đủ cao để gây ức chế nấm bệnh gián tiếp [53]. Có giả thuyết về hiệu ứng phản vệ bởi tác nhân kim loại cho rằng một số loài thực vật có khả năng siêu tích lũy kim loại và được xem như một chiến lược tự vệ để ngăn chặn sự tấn công của mầm bệnh. Do vậy, giữa thực vật và vi sinh vật luôn có sự cạnh tranh về các nguyên tố kim loại thiết yếu, đồng thời thiết lập được nồng độ tối thích. Như trường hợp đối với kẽm thì nồng độ Zn²⁺ không vượt quá 300 ppm, vì trên nồng độ này sẽ gây độc cho tế bào thực vật đồng thời giảm khả năng kháng cũng như diệt mầm bệnh [54].

Kết quả **Bảng 3.11** cũng cho thấy nghiệm thức OC 5,1 kDa và nghiệm thức xử lý với phức OC5,1-Zn²⁺ thể hiện hiệu ứng ức chế bệnh thán thư rất rõ ràng. Trong đó nghiệm thức xử lý với phức OC5,1-Zn²⁺ đạt hiệu quả ức chế bệnh cao nhất. Cụ thể giá trị DI ~38,7% và DS~17,7% là thấp hơn so với nghiệm thức xử lý OC (DI ~63,7% và DS~47,7%) và nghiệm thức đối chứng + (DI ~91,3% và DS~79,7%). Kết quả này cũng có liên quan thuận với kết quả kích tạo hoạt tính chitinase ở **Bảng 3.10**. Hoạt tính chitinase càng cao thì hiệu quả ức chế bệnh thán thư càng mạnh.

Kết quả nhận được ở đây cũng có xu hướng tương tự như báo cáo của các nhóm tác giả khác [32, 56, 87, 152]. Hơn nữa, hiệu lực kiểm soát bệnh thán thư so với đối chứng của phức OC5,1-Zn²⁺ là DI giảm ~58% và DS giảm ~78%. Kết quả này tương tự như kết quả thực nghiệm hiệu lực ức chế bệnh thán thư trên cây đậu nành trồng trong chậu được xử lý với các thuốc hóa học trị bệnh thông dụng (carbendazim, propiconazole, difenconazole,..), giảm so đối chứng trong khoảng 41% – 77% [65]. Do vậy, phức OC-Zn²⁺ rất có tiềm năng áp dụng làm chế phẩm nông dược trừ bệnh thán thư cho cây đậu nành.

Từ các kết quả thu được trong các nội dung nghiên cứu như trên cho thấy rằng hoạt lực ức chế nấm *C. truncatum* gây bệnh thán thư và hiệu quả phòng trừ bệnh thán thư (kích tạo enzyme chitinase, giảm chỉ số và tỷ lệ bệnh) trên cây đậu nành của phức OC-Zn²⁺ có thể được điều chỉnh bởi hàm lượng Zn²⁺ (thông qua tỷ lệ phần mol), OC hoặc bởi KLPT của OC.

Trên cơ sở kết quả thu được từ các nội dung nghiên cứu trên, trong công trình nghiên cứu này lựa chọn công thức phức OC-Zn²⁺ được chế tạo từ OC cắt mạch bức xạ có KLPT ~5,1 kDa tạo phức với Zn²⁺ theo tỷ lệ phần mol (-NH₂/Zn²⁺) 1/0,5 để khảo sát hiệu quả kích kháng, phòng trừ bệnh và hiệu lực nông học của chế phẩm trên cây đậu nành trồng ở ruộng khảo nghiệm.

3.5. Hiệu quả phòng trừ bệnh và hiệu lực nông học của phức oligochitosan-Zn²⁺ đối với cây đậu nành trồng trên ruộng thí nghiệm

Trên cơ sở kết quả phân tích các đặc trưng tính chất hóa lý của OC 5,1 kDa; kết quả hoạt tính sinh học (chỉ tiêu sinh trưởng, hiệu quả phòng trừ bệnh thán thư) của phức OC5,1-Zn²⁺ (tỷ lệ mol 1/0,5) và nồng độ sử dụng phun phức OC5,1-Zn²⁺ (50 ppm) trên cây đậu nành trồng trong nhà kính; đồng thời điều kiện để thực hiện trên ruộng thí nghiệm có một số hạn chế, nên trong nội dung nghiên cứu này chỉ thực hiện khảo sát trên 3 mẫu là đối chứng, OC 5,1 kDa và mẫu phức OC5,1-Zn²⁺. Hơn nữa, trong điều kiện ruộng thí nghiệm, do nguy cơ phát tán bệnh dịch nên không được

phép phun nấm *C. truncatum* để gây nhiễm bệnh thán thư cho cây đậu nành. Do vậy, nội dung nghiên cứu này chỉ thực hiện khảo sát tác động của phức OC-Zn²⁺ đến khả năng phòng trừ bệnh hại và năng suất đậu nành trong điều kiện cách tác tự nhiên.

Mục tiêu nghiên cứu của nội dung này: Đánh giá ảnh hưởng của 02 chế phẩm dung dịch OC 5,1 kDa và phức OC5,1-Zn²⁺ phun qua lá đến hiệu ứng kích kháng bệnh (kích tạo enzyme chitinase), sinh trưởng phát triển, tình hình nấm bệnh hại, năng suất và hiệu quả kinh tế cây đậu nành trong điều kiện canh tác thực tế trên đồng ruộng nhằm làm cơ sở định hướng phát triển ứng dụng chế phẩm vào thực tiễn.

Kết quả khảo nghiệm

3.5.1. Ảnh hưởng của oligochitosan và oligochitosan-Zn²⁺ đến hiệu quả phòng trừ bệnh hại trên cây đậu nành thời điểm ra hoa (36 - 39 ngày)

Bảng 3.12: Hoạt tính chitinase, chỉ số sâu cuốn lá và bệnh hại trên cây đậu nành được xử lý phun OC 5,1 kDa và phức OC5,1-Zn²⁺ (tại thời điểm 38 ngày sau gieo)

Nghiệm thức	Hoạt tính chitinase, (mU/g lá tươi)	Sâu cuốn lá, (%)	Bệnh hại, (cấp)	
			Đốm nâu	Sương mai
1. Phun nước (ĐC)	0,88 ^c ± 0,18	9,43	2,67 ^a	1,63
2. Phun OC 5,1	4,15 ^b ± 0,57	8,53	2,61 ^a	1,40
3. Phun OC5,1-Zn ²⁺	7,93 ^a ± 0,63	7,67	1,17 ^b	1,10
CV%	13,45	14,22	11,58	10,07
LSD _{0,05}	1,32	NS	0,68	NS

*Các số trung bình trong cùng một cột mang ký tự giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê; và NS: Không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê với mức xác suất tin cậy $p < 0,05$.

Sâu bệnh là một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến năng suất và chất lượng hạt đậu nành. Giống tốt, ngoài những tiêu chuẩn về sinh trưởng, phát triển và năng suất còn phải có khả năng chống chịu sâu bệnh tốt. Điều kiện khí hậu Đồng Nai thuận lợi cho đậu nành sinh trưởng phát triển, đồng thời cũng tạo điều kiện cho một số loại sâu bệnh hại phát triển và gây hại. Theo kết quả điều tra, ở giai đoạn ra hoa, cây thí nghiệm bị gây hại chủ yếu là sâu cuốn lá (*Lamprosema indicata*) tuy nhiên ở mức độ thấp. Kết quả trình bày ở [Bảng 3.12](#) cho thấy sâu cuốn lá gây hại cao nhất là nghiệm thức đối chứng là 9,4%, các nghiệm thức phun OC 5,1 kDa và phức OC5,1-Zn²⁺ với

mức độ gây hại dao động từ 7,6 – 8,5% nhưng không khác biệt ý nghĩa thống kê.

Hiệu quả kích tạo enzyme chitinase kháng bệnh có sự khác biệt ý nghĩa giữa các nghiệm thức. Cụ thể tại thời điểm 3 ngày sau phun lần 03, giá trị CA đạt cao nhất là 7,93 mU/g lá tươi đối với nghiệm thức phun phức OC5,1-Zn²⁺, so với 4,15 mU/g lá tươi khi xử lý với OC 5,1 kDa, trong khi mẫu đối chứng là 0,88 mU/g lá tươi.

Về kết quả bệnh gây hại cho thấy các nghiệm thức thí nghiệm đều bị đốm lá (*Septoria glycines*), và sương mai (*Peronospora manshurica*) nhưng chủ yếu gây hại tầng lá già bên dưới và ở mức độ nhẹ không gây ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng của cây đậu nành. [Martos và cộng sự](#) (2016) đã minh chứng hiệu lực kích kháng nấm bệnh và tăng trưởng cây rau hiệu quả cao của kẽm thông qua tác động gây độc trực tiếp lên tế bào nấm bệnh và hiệu ứng gián tiếp thông qua kích ứng hệ thống phản vệ tế bào thực vật [55]. [Cabot và cộng sự](#) (2019) cũng đã công bố hiệu quả ức chế nấm bệnh của phức kẽm nhờ vào hiệu ứng tác động thích hợp và duy trì [53]. [Palacio-Márquez và cộng sự](#) (2021) cũng minh chứng hiệu quả kích thích tăng trưởng, tăng năng suất nổi trội của phức chitosan-Zn²⁺ trên cây đậu do gia tăng khả năng đồng hóa đạm và tăng hiệu suất quang hợp [162].

3.5.2. Ảnh hưởng của oligochitosan và oligochitosan-Zn²⁺ đến các chỉ tiêu sinh trưởng và các yếu tố cấu thành năng suất của đậu nành

Bảng 3.13: Các chỉ tiêu sinh trưởng và các yếu tố cấu thành năng suất của đậu nành được xử lý phun OC 5,1 kDa và phức OC5,1-Zn²⁺

Nghiệm thức	Chiều cao cây (cm)	Trọng lượng khô, (g/5 cây)	Trọng lượng 1.000 hạt, (g)
1. Phun nước (ĐC)	44,43	109,33 ^b	152,1
2. Phun OC 5,1 kDa	47,67	131,17 ^a	150,7
3. Phun OC5,1-Zn ²⁺	48,67	140,93 ^a	154,8
<i>CV</i> (%)	8,63	11,16	8,61
<i>LSD</i> _{0,05}	<i>NS</i>	10,42	<i>NS</i>

*NS: Không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê với mức xác suất tin cậy $p < 0,05$.

Qua số liệu trình bày ở [Bảng 3.13](#) và [Hình 3.28](#) cho thấy khi sử dụng OC 5,1 kDa và phức OC5,1-Zn²⁺ phun bổ sung qua lá 03 lần trong suốt thời gian sinh trưởng của cây đậu nành trồng trên đất đỏ bazan cho thấy: chiều cao cây khác biệt không có ý nghĩa thống kê, với chiều hướng cao hơn khi phun OC 5,1 kDa và phức OC5,1-

Zn^{2+} , chiều cao đạt từ 47,6 – 48,8 cm so với chiều cao 44,4 cm khi phun nước. Trọng lượng 1.000 hạt khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với đối chứng tuy nhiên cũng có chiều hướng lớn hơn khi sử chế phẩm phun lá OC và OC- Zn^{2+} .

Chỉ tiêu trọng lượng khô có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng, dao động từ 131,2 – 143,9 g/5cây so với 105,3 g/5cây khi phun nước, chứng tỏ khi phun OC 5,1 kDa và phức OC5,1- Zn^{2+} đã thúc đẩy quá trình trao đổi chất tốt hơn giúp cây tổng hợp và tích lũy dưỡng chất tốt hơn nên tạo sinh khối lớn hơn. Kết quả của *Costales và cộng sự* (2016) cũng đã ghi nhận hiệu quả kích thích tăng trưởng trên cây đậu nành được xử lý phun OC có xu hướng tăng chiều cao cây, số lá, số quả, hàm lượng chất khô và tăng lượng nốt sần. Phun lá OC làm tăng hàm lượng chlorophyll, tăng hàm lượng phospho và nitơ trong lá, tăng hoạt tính enzyme nitrate reductase và các yếu tố khác tham gia thúc đẩy quang tổng hợp và tăng hấp thu dinh dưỡng của cây đậu nành [129].



Hình 3.28: Cây đậu nành giai đoạn quả chắc xanh

3.5.3. Ảnh hưởng của oligochitosan và oligochitosan- Zn^{2+} đến yếu tố cấu thành năng suất và năng suất của đậu nành

Kết quả trình bày ở [Bảng 3.14](#) và [Hình 3.29](#) cho thấy khi phun OC 5,1 kDa và phức OC5,1- Zn^{2+} đã làm tăng chỉ tiêu số quả chắc/cây và tăng năng suất thực thu từ 11,9% đến 19,2% tương ứng so với nghiệm thức đối chứng.

Tuy nhiên, sau 03 lần phun OC 5,1 kDa thì chỉ tiêu quả chắc cũng như năng suất thực thu của đậu nành chưa đạt mức khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Trong khi đó, nghiệm thức phun phức OC5,1-Zn²⁺ thì chỉ tiêu số quả chắc trên cây và năng suất thực thu đều tăng khác biệt so với đối chứng. Cụ thể là khi phun 3 lần dung dịch phức OC5,1-Zn²⁺, chỉ tiêu quả chắc đạt 45,5 quả/cây, năng suất thực thu đạt 2,61 tấn/ha so với nghiệm thức đối chứng đạt giá trị tương ứng là 35,25 quả/cây và 2,19 tấn/ha.

So sánh hiệu quả tăng năng suất thực thu giữa 2 nghiệm thức phun OC 5,1 kDa và phức OC5,1-Zn²⁺, từ kết quả **Bảng 3.14** nhận thấy rằng sự khác biệt về năng suất giữa các nghiệm thức không có ý nghĩa thống kê. Mặc dù vậy, khi phun phức OC5,1-Zn²⁺ năng suất tăng so với đối chứng đạt 0,42 tấn/ha, cao hơn so với nghiệm thức phun OC 5,1 kDa (chỉ tăng 0,26 tấn/ha).

Bảng 3.14: Các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất của cây đậu nành được xử lý phun OC 5,1 kDa và phức OC5,1-Zn²⁺

Nghiệm thức	Số quả chắc (quả/cây)	NSTT (tấn/ha)	Năng suất tăng so với đối chứng	
			Tấn/ha	%
1. Phun nước (ĐC)	35,25 ^b	2,19 ^b	-	-
2. Phun OC 5,1 kDa	40,25 ^{ab}	2,45 ^{ab}	0,26	11,9
3. Phun OC5,1-Zn ²⁺	45,50 ^a	2,61 ^a	0,42	19,2
<i>CV</i> (%)	10,12	9,35		
<i>LSD</i> _{0,05}	6,36	0,33		

* NSTT: Năng suất thực thu.

Kết hợp kết quả **Bảng 3.14** với **Bảng 3.13**, có thể luận ra rằng hiệu quả tăng năng suất đậu nành của 2 chế phẩm OC 5,1 kDa và phức OC5,1-Zn²⁺ chủ yếu là tăng số lượng hạt chắc trên cây. Kết quả này cũng ghi nhận trên cây ớt [32] xử lý phun lá với OC. Dựa trên kết quả thu được trong nghiên cứu này và các kết quả khác [32], có thể suy ra rằng việc áp dụng các chế phẩm OC 5,1 kDa và phức OC5,1-Zn²⁺ phun qua lá cho cây đậu nành đã kích thích nở hoa tốt hơn. Điều đó có nghĩa là có nhiều hoa hơn để kết trái tạo hạt chắc trên mỗi cây so với đối chứng.



Hình 3.29: Đậu nành giai đoạn quả chín trước khi thu hoạch

3.5.4. Ảnh hưởng của phun oligochitosan và phức oligochitosan-Zn²⁺ đến năng suất đậu nành và hiệu quả kinh tế

Bảng 3.15: Năng suất đậu nành và hiệu quả kinh tế.

Nghiệm thức	NSTT (tấn/ha)	Tăng thu		Tăng chi (1.000 đ)	Lãi ròng (1.000 đ)
		Tấn/ha	1.000 đ		
1. Phun nước (ĐC)	2,19	-	-	-	-
2. Phun OC 5,1 kDa	2,45	0,26	4.160	1.110	3.050
3. Phun OC5,1-Zn ²⁺	2,61	0,42	6.720	1.170	5.550

Ghi chú

- Giá đậu nành: 16.000 đ/kg
- Oligochitosan: 70.000 đ/lít
- Oligochitosan-Zn²⁺: 90.000 đ/lít
- Công phun: 300.000 đ/ha

Kết quả trình bày ở **Bảng 3.15** cho thấy khi sử dụng chế phẩm OC 5,1 kDa và phức OC5,1-Zn²⁺ phun bổ sung trên cây đậu nành cho năng suất tăng so với đối chứng chỉ phun nước từ 0,26 – 0,42 tấn/ha. Lãi ròng thu được cho người trồng đậu nành từ 3.050.000 – 5.550.000 đ/ha/vụ.

Hiệu quả tăng năng suất ngô đáng kể trên ruộng thí nghiệm xử lý phun Zn²⁺, chitosan, và chitosan-Zn²⁺ nano cũng đã được **Choudhary và cộng sự** (2019) công bố [44]. Theo **Dar và cộng sự** (2013) đã nêu rằng, một trong những thách thức lớn để triển khai ứng dụng OC và các dẫn xuất của chúng trong bảo vệ cây trồng là thiết lập phương pháp chế tạo lượng lớn chế phẩm có hiệu ứng cao nhưng giá thành phải chăng [170]. Phương pháp chiếu xạ dung dịch chitosan kết hợp lượng nhỏ H₂O₂ để chế tạo OC, và phối trộn với muối kẽm để tạo chế phẩm phức OC-Zn²⁺ có hiệu ứng kích tạo enzyme chitinase kháng bệnh hiệu quả, đồng thời không ảnh hưởng bất lợi cho sinh trưởng phát triển và tăng năng suất của cây đậu nành nên được đánh giá là khả thi để thực hiện phát triển ứng dụng vào thực tiễn.

Kết luận và kiến nghị từ thực nghiệm trên ruộng

Các nghiệm thức sử dụng chế phẩm OC 5,1 kDa và phức OC5,1-Zn²⁺ thể hiện hiệu ứng kích kháng và phòng trừ bệnh hiệu quả thông qua hoạt tính enzyme chitinase tăng rõ rệt so với nghiệm thức đối chứng.

Các nghiệm thức thí nghiệm đều bị đốm lá (*Septoria glycines*) và sương mai (*Peronospora manshurica*); tuy nhiên bệnh xuất hiện muộn, vào giai đoạn 50 – 60 ngày sau gieo, chủ yếu gây hại ở tầng lá già bên dưới và ở mức độ nhẹ không gây ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng và năng suất của cây.

Các nghiệm thức sử dụng chế phẩm OC 5,1 kDa và phức OC5,1-Zn²⁺ phun qua lá, các chỉ tiêu sinh trưởng và năng suất có chiều hướng cao hơn so với đối chứng phun nước. Đặc biệt phun phức OC5,1-Zn²⁺ đã làm gia tăng năng suất đạt ~19% và khác biệt so với đối chứng. Qua đó, sơ bộ lãi ròng thu được cho người trồng đậu nành tăng thêm từ 3.050.000 – 5.550.000 đ/ha/vụ. Mặc dù vậy, đối với áp dụng chế phẩm OC phun 03 lần đã thể hiện hiệu ứng kích thích tăng trưởng (hàm lượng tích lũy chất khô) và kích kháng bệnh (tăng hoạt tính enzyme chitinase) rõ rệt nhưng về tăng năng suất chưa đạt mức khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng. Nguyên nhân có thể là phun 3 lần chưa đủ gây tạo tăng năng suất khác biệt.

Cần tiếp tục thực hiện khảo nghiệm đồng ruộng chế phẩm phức OC5,1-Zn²⁺ với số lần phun nhiều hơn 3 lần trên cây đậu nành nhằm tối ưu hiệu quả sử dụng chế phẩm để triển khai ứng dụng thực tiễn góp phần canh tác nông nghiệp bền vững, tăng hiệu quả kinh tế.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Trên cơ sở kết quả thu được về nghiên cứu chế tạo oligochitosan (OC), phức oligochitosan-Zn²⁺ (OC-Zn²⁺) và hiệu ứng sinh học trong phòng trừ bệnh thán thư, kích tạo enzyme chitinase, kích thích tăng trưởng và tăng năng suất của cây đậu nành, một số kết luận chính được đưa ra như sau:

1. Đã xác định điều kiện thích hợp (nồng độ chitosan, nồng độ H₂O₂, liều xạ) để cắt mạch chitosan tạo OC có KLPT 2,5 – 7,8 kDa.
2. Đã chế tạo thành công phức OC-Zn²⁺ với tỷ lệ mol –NH₂/Zn²⁺ và OC có KLPT khác nhau. Phức OC-Zn²⁺ chế tạo từ OC 5,1 kDa và tỷ lệ mol 1/0,5 có cấu trúc phức theo kiểu cầu nối ổn định, đạt hơn 92% lượng Zn²⁺ liên kết phối trí với OC.
3. Phức OC-Zn²⁺ có hiệu lực ức chế hiệu quả đối với nấm *C. truncatum* đạt từ 75,1 - 100% phụ thuộc nồng độ và tỷ lệ mol –NH₂/Zn²⁺ trong thí nghiệm *in vitro*.
4. Phức OC-Zn²⁺ thể hiện hiệu ứng kích tạo enzyme chitinase theo kiểu đồng vận và đồng thời gia tăng các chỉ tiêu sinh trưởng của đậu nành trong thí nghiệm nhà kính. Phức OC-Zn²⁺ chế tạo từ OC 5,1 kDa, tỷ lệ mol 1/0,5, với nồng độ xử lý phun lá 50 ppm đạt hiệu quả cao nhất trong số các nghiệm thức khảo sát.
5. Kết quả thí nghiệm đồng ruộng phun 03 lần qua lá dung dịch phức OC5,1-Zn²⁺ với nồng độ 50 ppm trong giai đoạn cây sinh trưởng đã làm tăng hoạt tính enzyme chitinase, giảm tỷ lệ và chỉ số bệnh, đảm bảo các chỉ tiêu tăng trưởng và gia tăng năng suất đậu nành ~19% (2,61 tấn/ha) so với đối chứng (2,19 tấn/ha).

Phức lai hữu cơ-vô cơ OC-Zn²⁺ phòng trừ bệnh hiệu quả và tăng năng suất đậu nành nên có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất nông sản an toàn, bền vững.

KIẾN NGHỊ

Để có thể phát triển ứng dụng thực tiễn phức OC-Zn²⁺ kiểm soát bệnh hại trên cây đậu nành, một số nội dung cần tiếp tục nghiên cứu được kiến nghị như sau:

1. Nghiên cứu đánh giá hiệu quả kích kháng và kiểm soát một số loại bệnh khác trên cây đậu nành của phức OC-Zn²⁺.
2. Phối hợp với các đơn vị có tiềm lực tổ chức sản xuất, triển khai khảo nghiệm diện rộng, hợp chuẩn hợp quy, thực hiện thủ tục cấp phép lưu hành, và thương mại hóa sản phẩm góp phần phát triển sản xuất nông nghiệp an toàn bền vững.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ

1. Dang Van Phu, Bui Duy Du, Le Nghiem Anh Tuan, Nguyen Quoc Hien*, *The study on antioxidant activity and enhancement of soybean seed yield of oligochitosan produced by gamma Co-60 irradiation*, Tạp chí Công nghệ Sinh học (ISSN: 1811-4989), **2017**, 15(3A), 179-184.
2. Dang Van Phu, Bui Duy Du, Le Nghiem Anh Tuan, Hoang Van Tam, Nguyen Quoc Hien*, *Preparation and foliar application of oligochitosan - nanosilica on the enhancement of soybean seed yield*, International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology (ISSN: 0974-1712), **2017**, 2(1), 421-428. DOI: 10.22161/ijeab/2.1.53.
3. Dang Van Phu, Bui Duy Du*, Le Nghiem Anh Tuan, Le Thanh Hung, Nguyen Quoc Hien, *Preparation of radiolysis-degraded oligochitosan, oligochitosan-Zn²⁺ complex and their induced effect against anthracnose on soybean plants*, Vietnam Journal of Chemistry (ISSN: 2525-2321), **2019**, 57(3), 363-367. DOI: 10.1002/vjch.201900045.
4. Dang Van Phu, Bui Duy Du*, Le Nghiem Anh Tuan, Le Thanh Hung, Hoang Dac Hiet, Nguyen Quoc Hien*, *Preparation and antifungal activity investigation of oligochitosan-Zn²⁺ on Colletotrichum truncatum*, International Journal of Polymer Science (ISSN: 1687-9422), **2019**, Article ID 8357381, 6 pages. DOI: 10.1155/2019/8357381. WoS (SCIE), IF: 2,792, Q2, H index: 50.
5. Phu Van Dang, Ha Thi Tran, Duy Ngoc Nguyen, Quoc Anh Le, Du Duy Bui, Hien Quoc Nguyen, Cong-Sac Tran, Ha Manh Bui, *Study on the chitinase-induced efficiency against anthracnose on soybean plant by oligochitosan-Zn²⁺ complexes*, Case Studies in Chemical and Environmental Engineering (Online ISSN: 2666-0164), **2023**, 7, Article ID 100285, 6 pages. DOI: 10.1016/j.cscee.2022.100285. Scopus, SJR: 1,26, Q1, H index: 22.
6. Dang Van Phu*, Nguyen Ngoc Duy, Le Anh Quoc, Bui Duy Du, Nguyen Quoc Hien, *Characterizations of oligochitosan-degraded irradiation and chitinase-induced efficiency by oligochitosan-Zn²⁺ complexes on soybean plant*, Proceedings of Vietnam Conference on Nuclear Science and Technology (ISBN: 978-604-67-2718-7), VINANST-15, Nha Trang City, Khanh Hoa, Vietnam, **2023**, pp. 404-410, Nxb Khoa học và Kỹ thuật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Panos I., Miralles B., Acosta N., Galed G., Heras A., 2009, Functional characterization of chitin and chitosan, *Current Chemical Biology*, 3(2), 203-230.
2. Nguyễn Quốc Hiến, 2017, *Công nghệ bức xạ biến tính vật liệu polyme*, Nxb Đại học Quốc gia TP. HCM, Trường ĐHKHTN – ĐHQG – TP. HCM.
3. Kumar M.N.V.R., 2000, A review on chitin and chitosan applications, *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1-27.
4. Dzung N.A., Thang N.T., 2002, Effects of oligoglucosamine prepared by enzyme degradation on the growth of soybean, *Advances of Chitin Science*, 5, 463-467.
5. Stasińska-Jakubas M., Hawrylak-Nowak B., 2022, Protective, biostimulating, and eliciting effects of chitosan and its derivatives on crop plants, *Molecules*, 27(9), 2801.
6. Dzung N.A., Anh P.Q., Hong P.T.A., 2007, Study on hydrolysis of chitosan by cellulase combined with gamma irradiation, *Advances of Chitin Science*, 10, 96-101.
7. Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F.M., Argüelles-Monal W., Desbrières J., Rinaudo M., 2001, An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, *Polymer*, 42(8), 3569-3580.
8. Yen M-T., Yang J-H., Mau J-L., 2009, Physical characterization of chitin and chitosan from crab shells, *Carbohydrate Polymers*, 75(1), 15-21.
9. Hai N.T.T., Thu L.H., Nga N.T.T., Hoa T.T., Tuan L.N.A., Phu D.V., Hien N.Q., 2019, Preparation of chitooligosaccharide by hydrogen peroxide degradation of chitosan and its effect on soybean seed germination, *Journal of Polymers and the Environment*, 27, 2098-2104.
10. Minh N.C., Hoa N.V., Trung T.S., 2020, *Preparation, properties, and application of low-molecular-weight chitosan*, Chapter 15 in Handbook of Chitin and Chitosan, 1, 453-471.
11. Jia Z., Shen D., 2002, Effect of reaction temperature and reaction time on the preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid, *Carbohydrate Polymers*, 49(4), 393-396.
12. Trombotto S., Ladavière C., Delolme F., Domard A., 2008, Chemical

- preparation and structural characterization of a homogeneous series of chitin/chitosan oligomers, *Biomacromolecules*, 9(7), 1731-1738.
13. Tømmeraas K., Vårum KM., Christensen BE., Smidsrød O., 2001, Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans, *Carbohydrate Research*, 333(2), 137-144.
 14. Xia Z., Wu S., Chen J., 2013, Preparation of water-soluble chitosan by hydrolysis using hydrogen peroxide, *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 242-245.
 15. Tian F., Liu Y., Hu K., Zhao B., 2004, Study of the depolymerization behavior of chitosan by hydrogen peroxide, *Carbohydrate Polymers*, 57(1), 31-37.
 16. Kumar A.B.V., Tharanathan R.N., 2004, A comparative study on depolymerization of chitosan by proteolytic enzymes, *Carbohydrate Research*, 58(3), 275-283.
 17. Olicón-Hernández D.R., Vázquez-Landaverde P.A., Cruz-Camarillo R., Rojas-Avelizapa L.I., 2017, Comparison of chito-oligosaccharide production from three different colloidal chitosans using the endochitonsanalytic system of *Bacillus thuringiensis*, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(2), 116-122.
 18. Wu S., 2012, Preparation of chitooligosaccharides from *Clanis bilineata* larvae skin and their antibacterial activity, *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), 1147-1150.
 19. Lv M., Hu Y., Gänzle M.G., Lin J., Wang C., Cai J., 2016, Preparation of chitooligosaccharides from fungal waste mycelium by recombinant chitinase, *Carbohydrate Research*, 430, 1-7.
 20. Sánchez Á., Mengíbar M., Rivera-Rodríguez G., Moerchbacher B., Acosta N., Heras A., 2017, The effect of preparation processes on the physicochemical characteristics and antibacterial activity of chitooligosaccharides, *Carbohydrate Polymers*, 157, 251-257.
 21. Xie H., Jia Z., Huang J., Zhang C., 2011, Preparation of low molecular weight chitosan by complex enzymes hydrolysis, *International Journal of Chemistry*, 3(2), 180-186.
 22. Hamer S.N., Cord-Landwehr S., Biarnés X., Planas A., Waegeman H., Moerschbacher B.M., Kolkenbrock S., 2015, Enzymatic production of defined chitosan oligomers with a specific pattern of acetylation using a combination of chitin oligosaccharide deacetylases, *Scientific Reports*, 5, 8716-8725.

23. Affes S., Maalej H., Aranaz I., Acosta N., Heras Á., Nasri M., 2020, Enzymatic production of low-Mw chitosan-derivatives: Characterization and biological activities evaluation, *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 279-288.
24. Kim SK., 2010, *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: Biological activities and applications*, Biological Activities and Applications, 1st Edition, CRC Press, Boca Raton, 666 pages.
25. Zainol I., Akil H.Md., Mastor A., 2009, Effect of γ -irradiation on the physical and mechanical properties of chitosan powder, *Materials Science and Engineering C*, 29(1), 292-297.
26. Hien N.Q., Phu D.V., Duy N.N., Lan N.T.K., 2012, Degradation of chitosan in solution by gamma irradiation in the presence of hydrogen peroxide, *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 935-938.
27. Duy N.N., Phu D.V., Anh N.T., Hien N.Q., 2011, Synergistic degradation to prepare oligochitosan by γ -irradiation of chitosan solution in the presence of hydrogen peroxide, *Radiation Physics and Chemistry*, 80(7), 848-853.
28. Ulanski P., von Sonntag C., 2000, OH-radical-induced chain scission of chitosan in the absence and presence of dioxygen, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 2(10), 2022-2028.
29. Tahtat D., Mahlous M., Benamer S., Khodja A.N., Youcef S.L., 2012, Effect of molecular weight on radiation chemical degradation yield of chain scission of γ -irradiated chitosan in solid state and in aqueous solution, *Radiation Physics and Chemistry*, 81(6), 659-665.
30. Makuuchi K., 2010, Critical review of radiation processing of hydrogel and polysaccharide. *Radiation Physics and Chemistry*, 79(3), 267-271.
31. Qin C.Q., Du Y.M., Xiao L., 2002, Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan, *Polymer Degradation and Stability*, 76(2), 211-218.
32. Dzung P.D., Hung L.T., Ngoc L.S., Hiet H.D., Le B.V., Thang N.T., Phu D.V., Duy N.N., Hien N.Q., 2017, Induction of anthracnose disease resistance on chili Fruit by treatment of oligochitosan-nanosilica hybrid material, *Agricultural Sciences*, 8(10), 1105-1113.
33. Yin H., Zhao X., Du Y., 2010, Oligochitosan: A plant disease vaccine - A review, *Carbohydrate Polymers*, 82(1), 1-8.
34. Ahmed K.B.M., Khan M.M.A., Siddiqui H., Jahan A., 2020, Chitosan and its

- oligosaccharides, a promising option for sustainable crop production-a review, *Carbohydrate Polymers*, 227, 115331.
35. Wang H., Cui H., Wang X., Lin C., Xia S., Hayat K., Hussain S., Tahir M.U., Zhang X., 2020, Metal complexed-enzymatic hydrolyzed chitosan improves moisture retention of fiber papers by migrating immobilized water to bound state, *Carbohydrate Polymers*, 235, 115967.
 36. Wang X., Du Y., Liu H., 2004, Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan–Zn complex, *Carbohydrate Polymers*, 56(1), 21-26.
 37. Khan A., Mehmood S., Shafiq M., Yasin T., Akhter Z., Ahmad S., 2013, Structural and antimicrobial properties of irradiated chitosan and its complexes with zinc, *Radiation Physics and Chemistry*, 91, 138-142.
 38. Rogina A., Lončarević A., Antunović M., Marijanović I., Ivanković M., Ivanković H., 2019, Tuning physicochemical and biological properties of chitosan through complexation with transition metal ions, *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 645-652.
 39. Simonescu C.M., Deleanu C., Mihai S., Capatina C., 2012, Studies on zinc removal from wastewaters by chitosan, *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 13(2), 462-475.
 40. Yazdani M.R., Virolainen E., Conley K., Vahala R., 2018, Chitosan–zinc(II) complexes as a bio-sorbent for the adsorptive abatement of phosphate: Mechanism of complexation and assessment of adsorption performance, *Polymers*, 10(1), 25-43.
 41. Rhazi M., Desbrières J., Tolaimate A., Rinaudo M., Vottero P., Alagui A., 2002, Contribution to the study of the complexation of copper by chitosan and oligomers, *Polymer*, 43(4), 1267-1276.
 42. Wang S-M., Huang Q-Z., Wang Q-S., 2005, Study on the synergetic degradation of chitosan with ultraviolet light and hydrogen peroxide, *Carbohydrate Research*, 340(6), 1143-1147.
 43. Back R.E., 2003, Zinc deficiency, infectious disease and mortality in the developing world, *The Journal of Nutrition*, 133(5), 1485S-1489S.
 44. Choudhary R.C., Kumaraswamy R.V., Kumari S., Sharma S.S., Pal A., Raliya R., Biswas P., Saharan V., 2019, Zinc encapsulated chitosan nanoparticle to promote maize crop yield, *International Journal of Biological Macromolecules*, 127, 126-135.
 45. Hassan O., Chang T., 2017, Chitosan for eco-friendly control of plant disease,

- Asian Journal of Plant Pathology*, 11(2), 53-70.
46. Kuć J., 2006, *What's old and what's new in concepts in "Mutigenic and induced systemic resistance in plants"*, T. Saclik and B. Elizabeth (Editors), Springer, 9-22.
 47. Benhamou N., 1996, Elicitor-induced plant defence pathways, *Trends in Plant Science*, 1(7), 233-240.
 48. Prashanth K.V.H., Tharanathan R.N., 2007, Chitin/chitosan: modification and their unlimited application potential – an overview, *Trends in Food Science & Technology*, 18(3), 117-131.
 49. Xing K., Zhu X., Peng X., Qin S., 2015, Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review, *Agronomy for Sustainable Development*, 35(2), 569-588.
 50. Malerba M., Cerana R., 2016, Chitosan effects on plant systems, *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 996-109.
 51. Costales-Menéndez D., Falcón-Rodríguez A.B., Nápoles-García M.C., Cabrera-Pino J.C., Varela-Nualles M., Travieso-Hernández L., 2021, Chitosan induces defensive responses in soybean plants inoculated with *Bradyrhizobium elkanii*, *Cultivos Tropicales*, 42(2), e07.
 52. Andreini C., Bertini I., Rosato A., 2009, Metalloproteomes: a bioinformatic approach, *Accounts of Chemical Research*, 42(10), 1471-1479.
 53. Cabot C., Martos S., Llugany M., Gallego B., Tolrà R., Poschenrieder C., 2019, A role for zinc in plant defense against pathogens and herbivores, *Frontiers in Plant Science*, 10, 1171.
 54. Helfenstein J., Pawlowski M.L., Hill C.B., Stewart J., Lagos-Kutz D., Bowen C.R., Frossard E., Hartman G.L., 2015, Zinc deficiency alters soybean susceptibility to pathogens and pests, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 178, 896-903.
 55. Martos S., Gallego B., Cabot C., Llugany M., Barceló J., Poschenrieder C., 2016, Zinc triggers signaling mechanisms and defense responses promoting resistance to *Alternaria brassicicola* in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Science*, 249, 13-24.
 56. Aziz A., Trotel-Aziz P., Dhuicq L., Jeandet P., Couderchet M., Vernet G., 2006, Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew, *Phytopathology*, 96(11), 1188-1194.

57. Sharma N., Sharma K.P., Gaur R.K., Gupta V.K., 2011, Role of Chitinase in Plant Defense, *Asian Journal of Biochemistry*, 6(1), 29-37.
58. Grover A., 2012, Plant chitinases: Genetic diversity and physiological roles, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 57-73.
59. Li H., Greene L.H., 2010, Sequence and structural analysis of the chitinase insertion domain reveals two conserved motifs involved in chitin-binding, *PLoS ONE*, 5(1), e8654.
60. Jahagirdar S., 2019, Present status and future research dimensions of soybean diseases for sustainable productivity of soybean in India, *Indian Phytopathology*, 72, 3-14.
61. Mai Quang Vinh, 2012, *Kỹ thuật gieo trồng các giống đậu tương mới*, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn – Trung tâm Khuyến nông Quốc gia, 126 tr, Hà Nội.
62. Gawade D.B., Suryawanshi A.P., Pawar A.K., Apet K.T., Devgire S.S., 2009, Field evaluation of fungicides, botanicals and bioagents against anthracnose of soybean, *Agricultural Science Digest*, 29(3), 174-177.
63. Bouffleur T.R., Ciampi-Guillardi M., Tikami Í., Rogério F., Thon M.R., Sukno S.A., Júnior N.S.M., Baroncelli R., 2021, Soybean anthracnose caused by *Colletotrichum* species: Current status and future prospects, *Molecular Plant Pathology*, 22(4), 393-409.
64. Nagaraj B.T., Jahagirdar S., 2014, Morphological and molecular variability of *Colletotrichum truncatum* (SCHW.) Andrus and Moore isolates pathogenic to soybean in India, *The Bioscan*, 9(3), 1251-1256.
65. Agam M.N., Raut R.A., Jejurkar G.B., Sable S.B., 2019, Evaluation of the fungicides, botanicals and bioagents against *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose of soybean in pot culture, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(2), 629-634.
66. Zou P., Li K., Liu S., Xing R., Qin Y., Yu H., Zhou M., Li P., 2015, Effect of chitoooligosaccharides with different degrees of acetylation on wheat seedlings under salt stress, *Carbohydrate Polymers*, 126, 62-69.
67. Nghiep D.N., Kim M.M., Kim S.K., 2012, Protective effects of aminoethyl-chitoooligosaccharides against oxidative stress in mouse macrophage RAW 264.7 cells, *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(3), 624-631.
68. Luo L., Cai X., He C., Xue M., Wu X., Cao H., 2009, Immune response, stress

- resistance and bacterial challenge in juvenile rainbow trouts *Oncorhynchus mykiss* fed diets chitosan-oligosaccharides, *Current Zoology*, 55(6), 416-422.
69. No H.K., Park N.Y., Lee S.H., Meyers S.P., 2002, Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights, *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 65-72.
 70. Xu J., Zhao X., Han X., Du Y., 2007, Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant fungi in vitro, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87(3), 220-228.
 71. Zhao X., She X., Du Y., Liang X., 2007, Induction of antiviral resistance and stimulatory effect by oligochitosan in tobacco, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87(1), 78-84.
 72. Khalil M.S., Badawy M.E.I., 2012, Nematicidal activity of a biopolymer chitosan at different molecular weights against root-knot nematode, *Plant Protection Science*, 48(4), 170-178.
 73. Kidaj D., Wielbo J., Skorupska A., 2012, Nod factors stimulate seed germination and promote growth and nodulation of pea and vetch under competitive conditions, *Microbiological Research*, 167(3), 144-150.
 74. Dzung N.A., Khanh V.T.P., Dzung T.T., 2011, Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee, *Carbohydrate Polymers*, 84(2), 751-755.
 75. El-Sawy N.M., El-Rehim H.A.A., Elbarbary A.M., Hegazy E-S.A., 2010, Radiation-induced degradation of chitosan for possible use as a growth promoter in agricultural purposes, *Carbohydrate Polymers*, 79(3), 555-562.
 76. Luan L.Q., Ha V.T.T., Nagasawa N., Kume T., Yoshii F., Nakanishi T.M., 2005, Biological effect of irradiated chitosan on plants *in vitro*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 41(1), 49-57.
 77. Muley A.B., Shingote P.R., Patil A.P., Dalvi S.G., Suprasanna P., 2019, Gamma radiation degradation of chitosan for application in growth promotion and induction of stress tolerance in potato (*Solanum tuberosum* L.), *Carbohydrate Polymers*, 210, 289-301.
 78. Rodríguez A.T., Ramírez M.A., Cárdenas R.M., Hernández A.N., Velázquez M.G., Bautista S., 2007, Induction of defense response of *Oryza sativa* L. against *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. by treating seeds with chitosan and hydrolyzed chitosan, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89(3), 206-215.
 79. Prapagdee B., Kotchadat K., Kumsopa A., Visarathanonth N., 2007, The role of

- chitosan in protection of soybean from sudden death syndrome caused by *Fusarium solani f. sp. glycines*, *Bioresource Technology*, 98(7), 1353-1358.
80. Hirano S., Hayashi M., Okuno S., 2001, Soybean seeds surface-coated with depolymerised chitins: chitinase activity as a predictive index for the harvest of beans in field culture, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(2), 205-209.
 81. Ibrahim E.A., Ramadan WA., 2015, Effect of zinc foliar spray alone and combined with humic acid or/and chitosan on growth, nutrient elements content and yield of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants sown at different dates, *Scientia Horticulturae*, 184, 101-105.
 82. Nguyễn Quốc Hiến và cộng sự, 2008, *Nghiên cứu xử lý hóa học kết hợp với bức xạ chế tạo chất kích kháng bệnh sinh học dùng trong nông nghiệp cho cây lúa và cây mía*, Đề tài nghiên cứu khoa học Cấp Bộ, MS BO/06/07-09, Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai CN Bức xạ - TP. HCM, 76 tr.
 83. Nguyễn Quốc Hiến và cộng sự, 2007, *Nghiên cứu áp dụng kỹ thuật bức xạ chế tạo chất kích kháng bệnh sinh học cho cây mía*, Đề tài nghiên cứu khoa học Cấp Cơ sở, MS CS/06/07-01, Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai CN Bức xạ - TP. HCM, 68 tr.
 84. Hoàng Đắc Hiệt, Đặng Hữu Nghĩa, 2015, *Khảo sát hiệu ứng kích kháng bệnh than thur trên cây ớt (*Capsicum frutescens* L.) của chế phẩm nano silica sử dụng oligochitosan làm chất ổn định*, Đề tài nghiên cứu khoa học Cấp Cơ sở, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao - TP. HCM, 71 tr.
 85. Thuy N.N., Hai N.D., Dzung P.D, Phu D.V., Hien N.Q., Quy H.D., 2017, New oligochitosan-nanosilica hybrid materials: preparation and application on chili plants for resistance to anthracnose disease and growth enhancement, *Polymer Journal*, 49, 861-869.
 86. Lê N.Đ. Duy, Nguyễn T.K. Tuyền, Lương T. Lan, Nguyễn C. Hà, 2014, Nghiên cứu ứng dụng để ức chế nấm *Colletotrichum gloeosporioides* phân lập từ trái xoài cát Hòa Lộc bị bệnh than thur, *Tạp chí KH Trường ĐH Cần Thơ*, 4, 154-161.
 87. Tuan L.N.A., Du B.D., Ha L.D.T., Dzung L.T.K., Phu D.V., Hien N.Q., 2019, Induction of chitinase and brown spot disease resistance by oligochitosan and nanosilica–oligochitosan in dragon fruit plants, *Agricultural Research*, 8(2), 184-190.
 88. Mahmud M., Naziri M.I., Yacob N., Talip N., Abdullah Z., 2014, Degradation

- of chitosan by gamma ray with presence of hydrogen peroxide, *Advancing Nuclear Research and Energy Development*, AIP Conf. Proc., 1584, 136-140.
89. Kang B., Dai Y-D., Zhang H-Q., Chen D., 2007, Synergetic degradation of chitosan with gamma radiation and hydrogen peroxide, *Polymer Degradation and Stability*, 92(3), 359-362.
 90. ASTM International, 2004, *Standard practice for use of a dichromate dosimetry system, ISO/ASTM 51401:2003(E)*, Standards on dosimetry for radiation processing, 69-74.
 91. Hon D.N-S., Tang L-G., 2000, Chelation of chitosan derivatives with zinc ions. I. O,N-carboxymethyl chitosan, *Journal of Applied Polymer Science*, 77, 2246-2253.
 92. Guibal E., Vincent T., Navarro R., 2014, Metal ion biosorption on chitosan for the synthesis of advanced materials, *Journal of Materials Science*, 49, 5505-5518.
 93. Ma P.L., Lavertu M., Winnik F.M., Buschmann M.D., 2009, New insights into chitosan DNA interactions using isothermal titration microcalorimetry, *Biomacromolecules*, 10(6), 1490-1499.
 94. Bùi Phước Phúc, Hà Thúc Huy, Nguyễn Ngọc Duy, Đặng Văn Phú, Nguyễn Quốc Hiến, 2006, Nghiên cứu giảm cấp chitosan bằng hydroperoxit kết hợp với bức xạ gamma Co-60, *Tạp chí Hóa học và Ứng dụng*, 52(4), 29-32.
 95. Du D.X., Phuc B.P., Thuy T.T., Quoc L.A., Phu D.V., Hien N.Q., 2014, Study on gamma-irradiation degradation of chitosan swollen in H₂O₂ solution and its antimicrobial activity for *E. coli*, *Nuclear Science and Technology*, 4(4), 1-8.
 96. Huang C., Liao H., Liu X., Xiao M., Liao S., Gong S., Yang F., Shu X., Zhou X., 2022, Preparation and characterization of vanillin-chitosan Schiff base zinc complex for a novel Zn²⁺ sustained released system, *International Journal of Biological Macromolecules*, 194, 611-618.
 97. Wasikiewicz J.M., Yeates S.G., 2013, “Green” molecular weight degradation of chitosan using microwave irradiation, *Polymer Degradation and Stability*, 98(4), 863-867.
 98. Patale R.L., Patravale V.B., 2011, O,N-carboxymethyl chitosan-zinc complex: A novel chitosan complex with enhanced antimicrobial activity, *Carbohydrate Polymers*, 85(1), 105-110.
 99. Knaul J.Z., Kasaai M.R., Bui V.T., Creber K.A.M., 1998, Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review, *Canadian Journal*

- of Chemistry*, 76(11), 1699-1706.
100. Chokradjaroen C., Rujiravanit R., Watthanaphanit A., Theeramunkong S., Saito N., Yamashita K., Arakawa R., 2017, Enhanced degradation of chitosan by applying plasma treatment in combination with oxidizing agents for potential use as an anticancer agent, *Carbohydrate Polymers*, 167, 1-11.
 101. Shen K., Hu Q., Wang Z., Qu J., 2011, Effect of ^{60}Co irradiation on the properties of chitosan rod, *Materials Science and Engineering: C*, 31(5), 866-872.
 102. Czechowska-Biskup R., Wach R., Stojek P., Kamińska M., Rosiak J.M., Ulański P., 2016, Synthesis of chitosan and carboxymethyl chitosan hydrogels by electron beam irradiation, *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 21, 27-45.
 103. Mekahlia S., Bouzid B., 2009, Chitosan-Copper (II) complex as antibacterial agent: synthesis, characterization and coordinating bond- activity correlation study, *Physics Procedia*, 2(3), 1045-1053.
 104. Lončarević A., Ostojić K., Urlić I., Rogina A., 2003, Preparation and properties of bimetallic chitosan spherical microgels, *Polymers*, 15(6), 1480.
 105. Lavertu M., Xia Z., Serreqi A.N., Berrada M., Rodrigues A., Wang D., Buschmann M.D., Gupta A., 2003, A validated ^1H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(6), 1149-1158.
 106. Badawy M.E.I., Rabea E.I., 2011, A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection, *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2011, ID 460381, 1-29.
 107. Pereira A.G.B., Muniz E.C., Hsieh Y-L., 2015, ^1H NMR and ^1H - ^{13}C HSQC surface characterization of chitosan-chitin sheath-core nanowhiskers, *Carbohydrate Polymers*, 123, 46-52.
 108. Dahmane E.M., Taourirte M., Eladlani N., Rhazi M., 2014, Extraction and characterization of chitin and chitosan from *Parapenaeus longirostris* from Moroccan local sources, *International Journal of Polymer Analysis Characterization*, 19(4), 342-351.
 109. Eddy M., Tbib B., EL-Hami K., 2020, A comparison of chitosan properties after extraction from shrimp shells by diluted and concentrated acids, *Heliyon*, 6(2), e03486.

110. Mutlu N., Liverani L., Kurtuldu F., Galusek D., Boccaccini A.R., 2022, Zinc improves antibacterial, anti-inflammatory and cell motility activity of chitosan for wound healing applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 213, 845-857.
111. Kewsuwana P., Rujitanapanich S., Bhasabutra T., Puripunyanich V., Busamongkol A., Injarean U., Pichetpong P., 2014, Irradiated oligochitosan against *Colletotrichum gloeosporioides* in chili, *Energy Procedia*, 56, 274-279.
112. Zahid N., Maqbool M., Siddiqui Y., Manickam S., Ali A., 2015, Regulation of inducible enzymes and suppression of anthracnose using submicron chitosan dispersions, *Scientia Horticulturae*, 193, 381-388.
113. Savi G.D., Piacentini K.C., de Souza S.R., Costa M.E.B., Santos C.M.R., Scussel V.M., 2015, Efficacy of zinc compounds in controlling Fusarium head blight and deoxynivalenol formation in wheat (*Triticum aestivum* L.), *International Journal of Food Microbiology*, 205, 98-104.
114. Gautam C., Prabhu H.V., Nargund V.B., 2017, *In vitro* Evaluation of fungicides, botanicals and bioagents against *Peziotrichum corticolum* causing black banded disease of mango, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(3), 652-661.
115. Yang L-Y., Zhang J-L., Bassett C.L., Meng X-H., 2012, Difference between chitosan and oligochitosan in growth of *Monilinia fructicola* and control of brown rot in peach fruit, *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 254-259.
116. Jain S., Vaishnav A., Kumari S., Varma A., Tuteja N., Choudhary D.K., 2017, Chitinolytic *bacillus*-mediated induction of jasmonic acid and defense-related proteins in soybean (*Glycine max* L. Merrill) plant against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*, *Journal of Plant Growth Regulation*, 36(1), 200-214.
117. Zhao X., Wang W., Du Y., Yin H., 2016, *The application of oligosaccharides as plant vaccines*, in: H. Yin, Y. Du (Eds.), *Research Progress in Oligosaccharins*, Springer, NY, USA, pp. 83-95.
118. Noman A., Ali Q., Maqsood J., Iqbal N., Javed M.T., Rasool N., Naseem J., 2018, Deciphering physio-biochemical, yield, and nutritional quality attributes of water-stressed radish (*Raphanus sativus* L.) plants grown from Zn-Lys primed seeds, *Chemosphere*, 195, 175-189.
119. Patel K.V., Nath M., Bhatt M.D., Dobriyal A.K., Bhatt D., 2020, Nanofomulation of zinc oxide and chitosan zinc sustain oxidative stress and alter secondary metabolite profile in tobacco, *3 Biotech*, 10(11), 477.

120. Mirajkar S.J., Dalvi S.G., Ramteke S.D., Suprasanna P., 2019, Foliar application of gamma radiation processed chitosan triggered distinctive biological responses in sugarcane under water deficit stress conditions, *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 1212-1223.
121. Adamuchio-Oliveira L.G., Mazaro S.M., Mógor G., Sant'Anna-Santos B.F., Mógor Á.F., 2020, Chitosan associated with chelated copper applied on tomatoes: enzymatic and anatomical changes related to plant defense responses, *Scientia Horticulturae*, 217, 109431.
122. Zhang J., Kopparapu N.K., Yan Q., Yang S., Jiang Z., 2013, Purification and characterisation of a novel chitinase from persimmon (*Diospyros kaki*) with antifungal activity, *Food Chemistry*, 138(2-3), 1225-1232.
123. Miller G.L., 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
124. Ferrari A.R., Gaber Y., Fraaije M.W., 2014, A fast, sensitive and easy colorimetric assay for chitinase and cellulase activity detection, *Biotechnology for Biofuels*, 7, 37.
125. Kabir S.R., Rahman Md.M., Tasnim S., Karim Md.R., Khatun N., Hasan I., Amin R., Islam S.S., Nurujjaman Md., Kabir A.H., Sana N.K., Ozeki Y., Asaduzzaman A.K.M., 2016, Purification and characterization of a novel chitinase from *Trichosanthes dioica* seed with antifungal activity, *International Journal of Biological Macromolecules*, 84, 62-68.
126. Ali A., Zahid N., Manickam S., Siddiqui Y., Alderson P.G., Maqbool M., 2014, Induction of lignin and pathogenesis related proteins in dragon fruit plants in response to submicron chitosan dispersions, *Crop Protection*, 63, 83-88.
127. Lage D.A.C., Marouelli W.A., Duarte Hd.S.S., Café-Filho A.C., 2015, Standard area diagrams for assessment of powdery mildew severity on tomato leaves and leaflets, *Crop Protection*, 67, 26-34.
128. QCVN 01 - 168: 2014/BNNPTNT, “*Quy Chuẩn Kỹ Thuật Quốc Gia Về Phương Pháp Điều Tra Phát Hiện Dịch Hại Trên Cây Lạc, Đậu Tương*”, Bộ Nông nghiệp & PTNT ban hành tại Thông tư số 16/TT-BNNPTNT ngày 05 tháng 6 năm 2014.
129. Costales D., Falcón A.B., Nápoles M.C., de Winter J., Gerbaux P., Onderwater R.C.A., Wattiez R., Cabrera J.C., 2016, Effect of chitosaccharides in nodulation and growth *in vitro* of inoculated soybean, *American Journal of Plant Sciences*, 7(9), 1380-1391.

130. Hong D.D., Anh H.T.L., Tam L.T., Show P.L., Leong H.Y., 2019, Effects of nanoscale zerovalent cobalt on growth and photosynthetic parameters of soybean *Glycine max* (L.) Merr. DT26 at different stages, *BMC Energy*, 1(6), 1-9.
131. Song H-Y., Kim K-I., Han J.M., Park W.Y., Seo H.S., Lim S., Byun E-B., 2022, Ionizing radiation technology to improve the physicochemical and biological properties of natural compounds by molecular modification: A review, *Radiation Physics and Chemistry*, 194, ID 110013, 1-11.
132. Feng T., Du Y., Li J., Hu Y., Kennedy J.F., 2008, Enhancement of antioxidant activity of chitosan by irradiation, *Carbohydrate Polymers*, 73(1), 126-132.
133. Taşkın P., Canısağ H., Şen M., 2014, The effect of degree of deacetylation on the radiation induced degradation of chitosan, *Radiation Physics and Chemistry*, 94, 236-239.
134. Wasikiewicz J.M., Yoshii F., Nagasawa N., Wach R.A., Mitomo H., 2005, Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods, *Radiation Physics and Chemistry*, 73(5), 287-295.
135. Das S.N., Madhuprakash J., Sarma P.V.S.R.N., Purushotham P., Suma K., Manjeet K., Rambabu S., Gueddari N.E.E., Moerschbacher B.M., Podile A.R., 2015, Biotechnological approaches for field applications of chitooligosaccharides (COS) to induce innate immunity in plants, *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(1), 29-43.
136. Mourya V.K., Inamdar N.N., Choudhari Y.M., 2011, Chitooligosaccharides: Synthesis, characterization and applications, *Polymer Science Ser. A*, 53(7), 583-612.
137. Rao M.S., Chawla S.P., Chander R., Sharma A., 2011, Antioxidant potential of Maillard reaction products formed by irradiation of chitosan-glucose solution, *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 714-719.
138. Yoksan R., Akashi M., Miyata M., Chirachanchai S., 2004, Optimal γ -ray dose and irradiation conditions for producing low-molecular-weight chitosan that retains its chemical structure, *Radiation Research*, 161(4), 471-480.
139. Ma F., Wang Z., Zhao H., Tian S., 2012, Plasma depolymerization of chitosan in the presence of hydrogen peroxide, *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6), 7788-7797.
140. Queiroz M.F., Melo K.R.T., Sabry D.A., Sasaki G.L., Rocha H.A.O., 2015, Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation?, *Marine*

- Drugs*, 13(1), 141-158.
141. Vander P., Varum K.M., Domard A., Gueddari N.E.E., Moerschbacher B.M., 1998, Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves, *Plant Physiology*, 118(4), 1353–1359.
 142. El-Mohdy H.L.A., 2017, Radiation-induced degradation of sodium alginate and its plant growth promotion effect, *Arabian Journal of Chemistry*, 10(1), S431-S438.
 143. Franca E.F., Lins R.D., Freitas L.C.G., Straatsma T.P., 2008, Characterization of chitin and chitosan molecular structure in aqueous solution, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4(12), 2141-2149.
 144. Rinaudo M., 2006, Chitin and chitosan: Properties and applications, *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632.
 145. Nagasawa N., Mitomo H., Yoshi F., Kume T., 2000, Radiation-induced degradation of sodium alginate, *Polymer Degradation and Stability*, 69(3), 279-285.
 146. Kumirska J., Czerwicka M., Kaczyński Z., Bychowska A., Brzozowski K., Thöming J., Stepnowski P., 2010, Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan, *Marine Drugs*, 8(5), 1567-636.
 147. Zhang B., Lv D-D., Fang C-D., 2018, Chitooligosaccharide-metal ions complexes: insights from molecular dynamics simulations, *Colloid and Polymer Science*, 296, 245-250.
 148. Wang X., Du Y., Fan L., Liu H., Hu Y., 2005, Chitosan-metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis, characterization and structure-activity study, *Polymer Bulletin*, 55, 105-113.
 149. Vasyukova N.I., Zinov'eva S.V., Il'inskaya L.I., Perekhod E.A., Chalenko G.I., Gerasimova N.G., Il'ina A.V., Varlamov V.P., Ozeretskovskaya O.L., 2001, Modulation of plant resistance to diseases by water-soluble chitosan, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37(1), 103-109.
 150. Li P., Cao Z., Wu Z., Wang X., Li X., 2016, The effect and action mechanisms of oligochitosan on control of stem dry rot of *Zanthoxylum bungeanum*, *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1044.
 151. Ben-Shalom N., Fallik E., 2003, Further suppression of *Botrytis cinerea* disease in cucumber seedlings by chitosan-copper complex as compared with chitosan alone, *Phytoparasitica*, 31(1), 99-102.



152. Luan L.Q., Nagasawa N., Tamada M., Nakanish T.M., 2006, Enhancement of plant growth activity of irradiated chitosan by molecular weight fractionation, *Radioisotopes*, 55(1), 21-27.
153. Choudhary R.C., Kumaraswamy R.V., Kumari S., Pal A., Raliya R., Biswas P., Saharan V., 2017, *Synthesis, Characterization, and application of chitosan nanomaterials loaded with zinc and copper for plant growth and protection*, in R. Prasad *et al.* (eds.), *Nanotechnology*, Springer Nature Singapore Pte Ltd., 227-247.
154. Hajiboland R., Amirazad F., 2010, Growth, photosynthesis and antioxidant defense system in Zn-deficient red cabbage plants, *Plant, Soil & Environment*, 56(5), 209-217.
155. Younes I., Sellimi S., Rinaudo M., Jellouli K., Nasri M., 2014, Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities, *International Journal of Food Microbiolog*, 185, 57-63.
156. Bellich B., D'Agostino I., Semeraro S., Gamini A., Cesàro A., 2016, The Good, the Bad and the Ugly of Chitosans, *Marine Drugs*, 14(5), 99.
157. Pusztahelyi T., 2018, Chitin and chitin-related compounds in plant-fungal interactions, *Mycology*, 9(3), 189-201.
158. Falcón-Rodríguez A.B., Costales D., Cabrera J.C., Martínez-Téllez MA., 2011, Chitosan physico-chemical properties modulate defense responses and resistance in tobacco plants against the oomycete *Phytophthora nicotianae*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(3), 221-228.
159. Pichyangkura R., Chadchawan S., 2015, Biostimulant activity of chitosan in horticulture, *Scientia Horticulturae*, 196, 49-65.
160. Dodgson J.L.A., Dodgson W., 2017, Comparison of effects of chitin and chitosan for control of *Colletotrichum sp.* on cucumbers, *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(1), 87-93.
161. Dzung N.A., 2005, Application of Chitin, Chitosan and vatives for Agriculture in Vietnam, *Journal of chitin and Chitosan*, 10(3), 109-113.
162. Palacio-Márquez A., Ramírez-Estrada C.A., Gutiérrez-Ruelas N.J., Sánchez E., Ojeda-Barrios D.L., Chávez-Mendoza C., Sida-Arreola J.P., 2021, Efficiency of foliar application of zinc oxide nanoparticles versus zinc nitrate complexed with chitosan on nitrogen assimilation, photosynthetic activity, and production of green beans (*Phaseolus vulgaris L.*), *Scientia Horticulturae*, 288, 110297.

163. Zhang X., Li K., Liu S., Xing R., Yu H., Chen X., Li P., 2016, Size effects of chitooligomers on the growth and photosynthetic characteristics of wheat seedlings, *Carbohydrate Polymers*, 138, 27-33.
164. Mirbolook A., Rasouli-Sadaghiani M.H., Sepehr E., Lakzian A., Hakimi M., 2021, Synthesized Zn(II)-amino acid and -chitosan chelates to increase Zn uptake by bean (*Phaseolus vulgaris*) Plants, *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 831-847.
165. Balafrej H., Bogusz D., Triqui Z-E.A., Guedira A., Bendaou N., Smouni A., Fahr M., 2020, Zinc Hyperaccumulation in Plants: A Review, *Plants*, 9(5), 562.
166. Stanton C., Sanders D., Kramer U., Podar D., 2022, Zinc in plants: Integrating homeostasis and biofortification, *Molecular Plant*, 15(3), 65-85.
167. Gupta P., Ravi I., Sharma V., 2017, Induction of β -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*, *Journal of Plant Interactions*, 8(2), 155-161.
168. Mejía-Teniente L., Torres-Pacheco I., Gonzalez-Chavira M.M., Ocampo-Velazquez R.V., Herrera-Ruiz G., Chapa-Oliver A.M., Guevara-González RG., 2010, Use of elicitors as an approach for sustainable agriculture, *African Journal of Biotechnology*, 9, 9155-9162.
169. Yin H., Du Y., Dong Z., 2016, Chitin oligosaccharide and chitosan oligosaccharide: two similar but different plant elicitors, *Frontiers in Plant Science*, 7, 522.
170. Dar T.A., Uddin M., Khan M.M.A., Ali A., Mir S.R., Varshney L., 2015, Effect of Co-60 gamma irradiated chitosan and phosphorus fertilizer on growth, yield and trigonelline content of *Trigonella foenum-graecum* L., *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(3), 446-458.

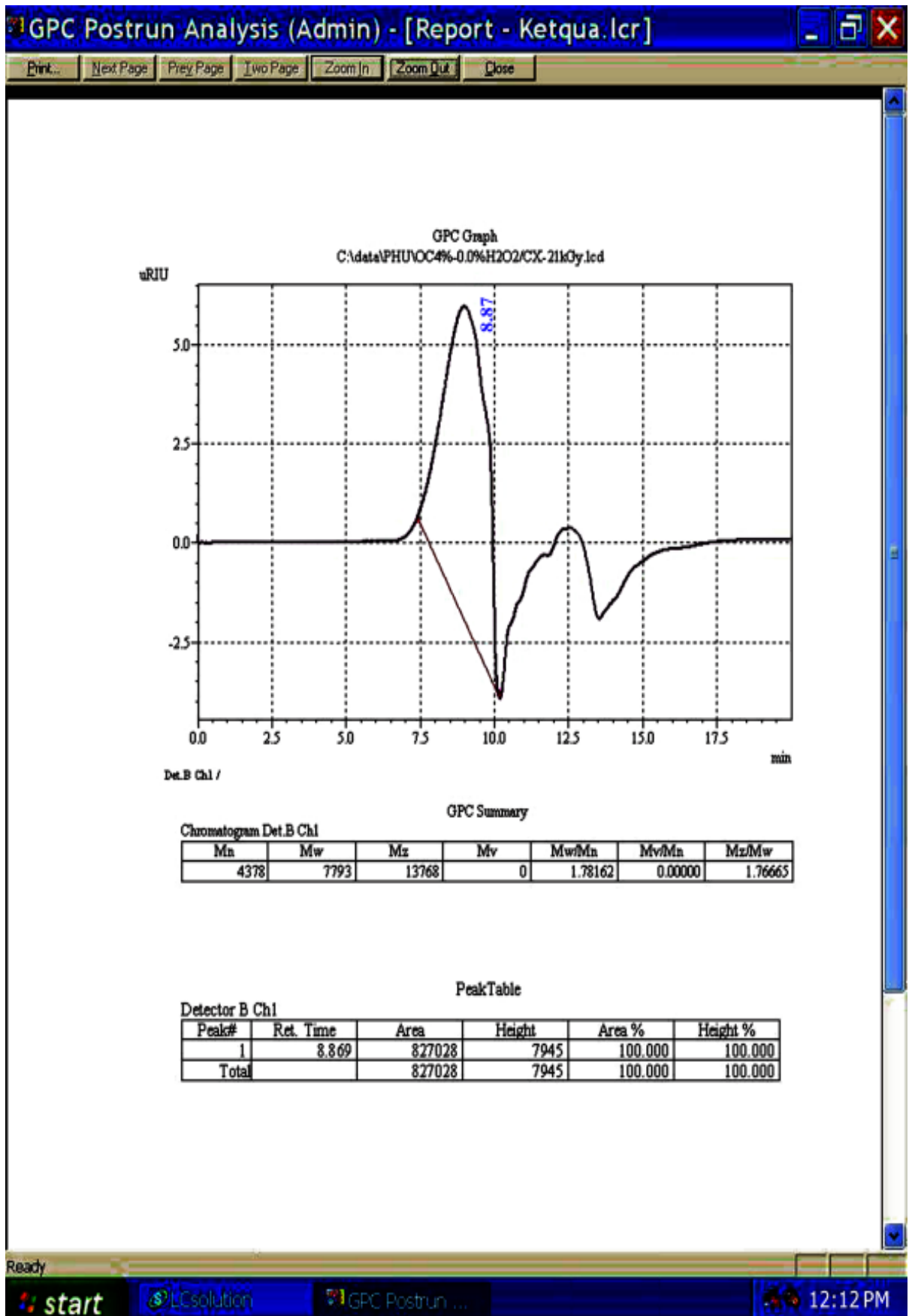
PHỤ LỤC KẾT QUẢ

1. Đặc trưng của chitosan nguyên liệu
2. Phổ GPC của các oligochitosan
3. Phổ FTIR của oligochitosan và phức oligochitosan-Zn²⁺
4. Phổ ¹H NMR của oligochitosan
5. Kết quả phân tích hàm lượng kẽm trong phức oligochitosan-Zn²⁺ bằng phương pháp ICP-AES
6. Hình ảnh khảo nghiệm hiệu ứng sinh học của oligochitosan và phức oligochitosan-Zn²⁺ đối với đậu nành trồng trên ruộng thí nghiệm.

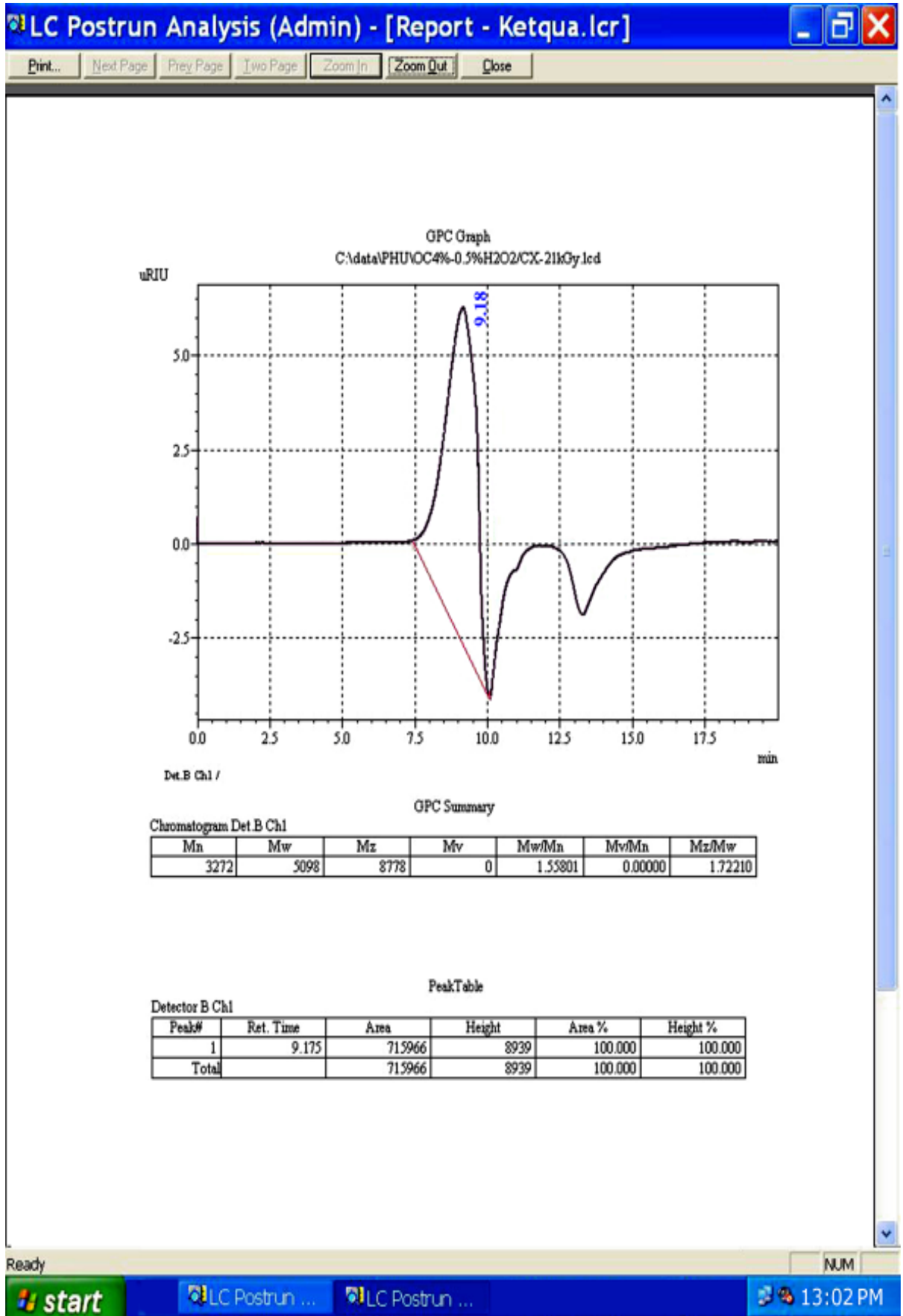
Phụ lục 1. Đặc trưng tính chất của chitosan nguyên liệu

 TỔNG CỤC TIÊU CHUẨN ĐO LƯỜNG CHẤT LƯỢNG TRUNG TÂM KỸ THUẬT TIÊU CHUẨN ĐO LƯỜNG CHẤT LƯỢNG 3 QUALITY ASSURANCE & TESTING CENTER 3		
KT3-04338TP9/1	PHIẾU KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM TEST REPORT	30/09/2011 Page 01/01
1. Tên mẫu/ <i>Name of sample</i> : CHITOSAN 2. Mô tả mẫu (<i>Sample description</i>): Dạng bột, vàng nhạt/ <i>as received sample is yellowish powder</i> 3. Số lượng/ <i>Quantity</i> : 500 g 4. Ngày nhận mẫu/ <i>Date of receiving</i> : 17/09/2011 5. Thời gian thử nghiệm/ <i>Testing duration</i> : 18/09/2011-30/09/2011 6. Nơi gửi mẫu/ <i>Customer</i> : Cty TNHH Phan Bù, Vũng tàu 7. Kết quả thử nghiệm/ <i>Test results</i> :		
Chi tiêu/ <i>Specification</i>	Phương pháp/ <i>Test method</i>	Kết quả/ <i>Test result</i>
7.1. Cảm quan/ <i>Appearance</i>	-	Bột vàng nhạt/ <i>Yellowish powder</i>
7.2. Cỡ hạt/ <i>Particle size</i>	Sieve of 100 mesh	< 100 mesh (90%)
7.3. Độ tro/ <i>Ash content</i>	FAO FNP 14/7 - 1986	0,3 %
7.4. Độ ẩm/ <i>Moisture content</i>	AOAC 2002 (925.10)	6,6 %
7.5. Độ de axetyl/ <i>Deacetylation degree</i>	IR method	> 90%
7.6. Hàm lượng cát sạn/ <i>Sand & silica content</i>	FAO FNP 5/Rev.1 - 1983	0,7 %
7.7. Khối lượng phân tử/ <i>Molecular weight</i>	GPC	171,3 kDa
7.8. Hàm lượng chì/ <i>Lead content</i>	AOAC 2002 (999.11)	0,7 mg/kg
7.9. Hàm lượng asen/ <i>Arsenic content</i>	AOAC 2002 (986.15)	< 0,01 mg/kg
7.10. Hàm lượng kim loại nặng qui ra chì/ <i>Heavy metal as lead</i>	JSFA III	< 2 mg/kg
7.11. Tổng vi khuẩn hiếu khí/ <i>Total aerobic plate count</i>	AOAC 2002 (966.22)	$1,2 \times 10^3$ CFU/g
7.12. <i>E.coli</i> CFU/g	SDP07/1 – 1993	Not detected
7.13. <i>Coliform</i> CFU/g	BS5763:1991	Not detected
7.14. <i>Salmonella</i> /25 g	AOAC 2002 (967.27)	Not detected
7.15. Nấm men & mốc/ <i>Yeast & mould</i>	FAO FNP 14/4 - 1992	< 100 CFU/g
TRƯỞNG PTN THỰC PHẨM HEAD OF FOOD TESTING LAB.  NGUYỄN THỊ LỆ		PHÓ GIÁM ĐỐC VICE DIRECTOR  TRẦN THỊ MỸ HIỀN
<small> 1. Các kết quả thử nghiệm ghi trong phiếu này chỉ có giá trị đối với mẫu do khách hàng gửi đến./ <i>Test results are valid for the namely submitted samples(s) only.</i> 2. Không được trích sao một phần phiếu kết quả thử nghiệm này nếu không có sự đồng ý bằng văn bản của Trung tâm Kỹ thuật 3. N/A: không áp dụng. Not applicable <i>This Test Report shall not be reproduced, except in full, without the written approval of Quatest 3.</i> 3. Tên mẫu, tên khách hàng được ghi theo yêu cầu của nơi gửi mẫu./ <i>Name of sample and customer are written as customer's request.</i> 4. Độ không đảm bảo do mở rộng ước lượng được tính với k = 2, ở mức tin cậy 95 %. Khách hàng có thể liên hệ theo địa chỉ dưới để biết thêm thông tin. <i>Estimated expanded uncertainty of measurement with k = 2, at 95 % confidence level. Please contact Quatest 3 at the below address for further information.</i> </small>		
Head Office: 49 Pasteur, Q1, Hồ Chí Minh City, VIỆT NAM Tel: (84-8) 3829 4274 Fax: (84-8) 3829 3012 Website: www.quatest3.com.vn Testing: 7 Road 1, Biên Hòa 1 Industrial Zone, Đồng Nai Tel: (84-61) 383 6212 Fax: (84-61) 383 6298 E-mail: qt-dichvutn@quatest3.com.vn		

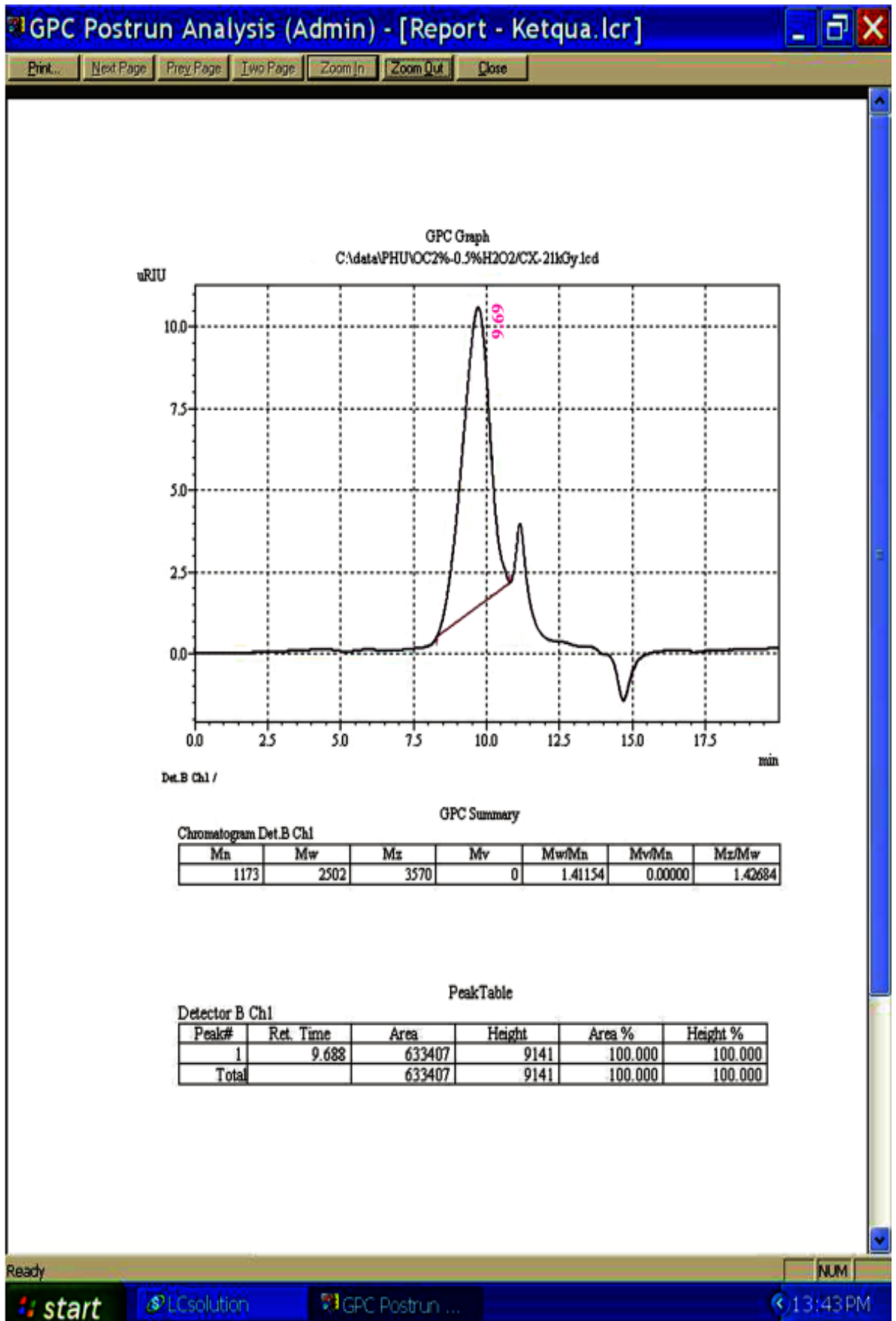
Phụ lục 2. Giải đồ GPC của mẫu oligochitosan



Giải đồ GPC của mẫu Oligochitosan KLPT 7,8 kDa

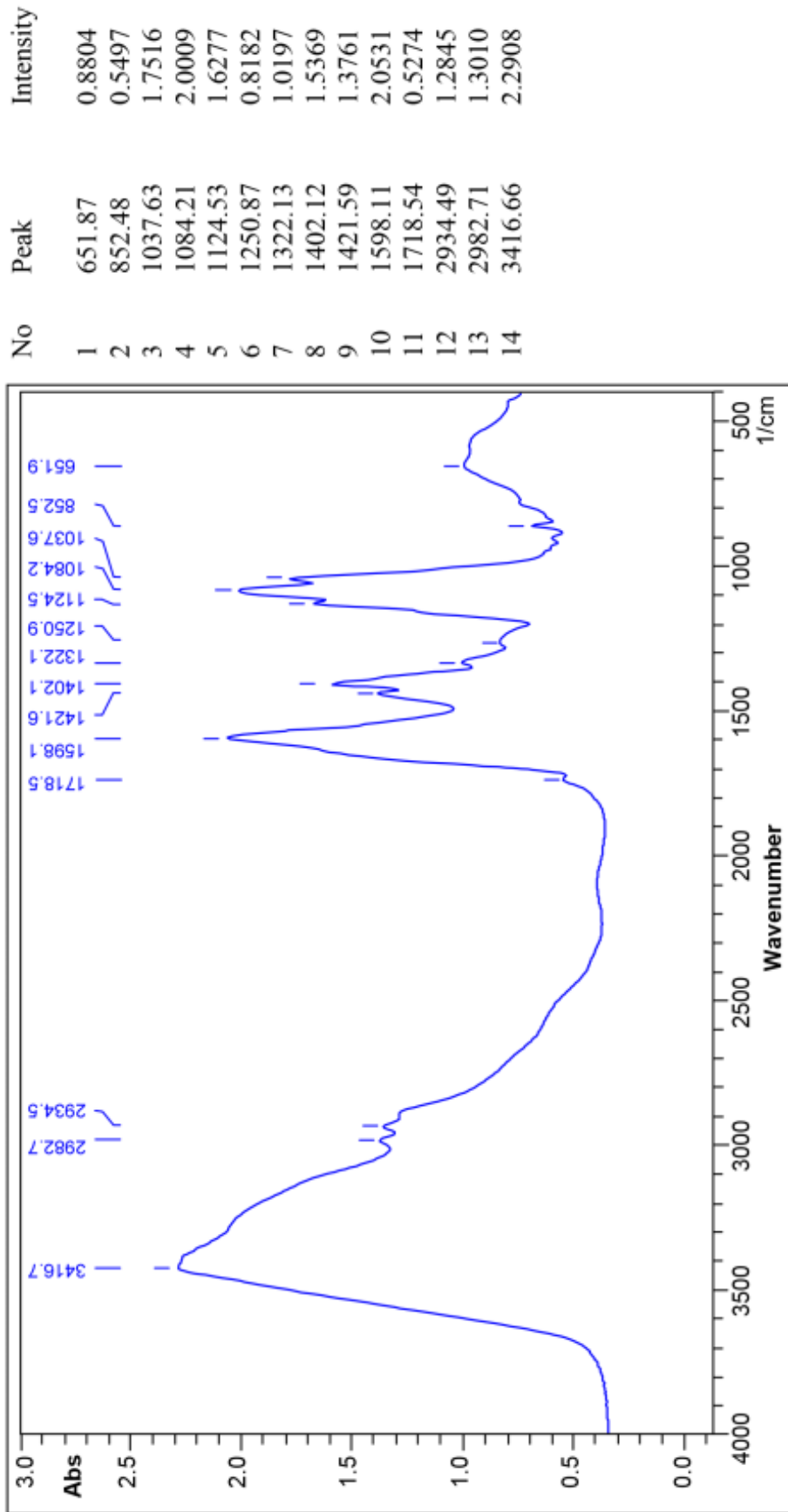


Giải đồ GPC của mẫu Oligochitosan KLPT 5,1 kDa



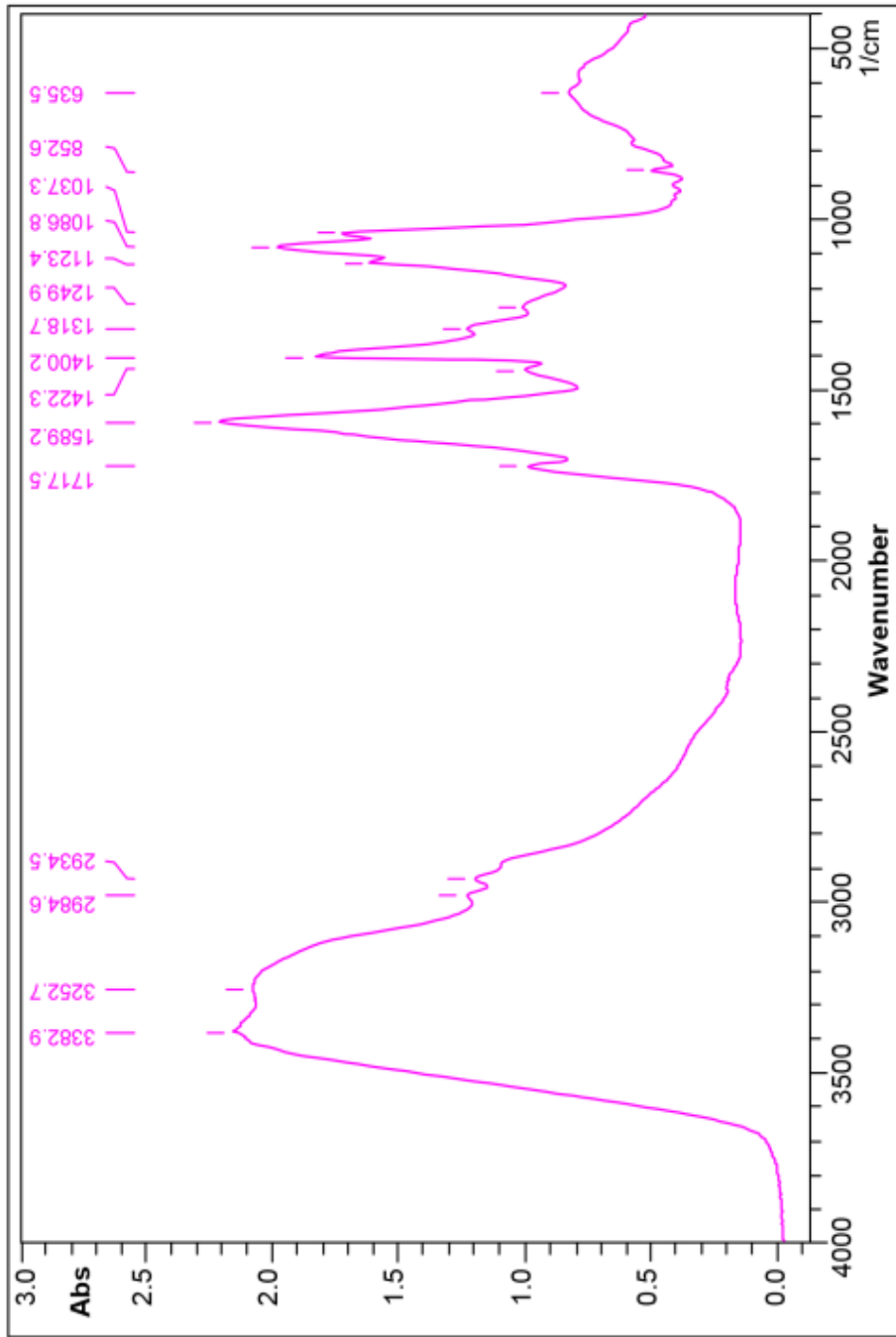
Giải đồ GPC của mẫu Oligochitosan KLPT 2,5 kDa

Phụ lục 3. Phổ FTIR của mẫu Oligochitosan và phức oligochitosan-Zn²⁺



Sample: OC-5.1kDa (CTS4%+0.5%H2O2/ Cx-21kGy)	Instrument: FTIR8400	IntensityMode: Absorbance	Frequency Range: 4000 - 400
Username: admin	No. of Scans: 40	Sample Scans: 6	Resolution: 2 cm ⁻¹
Technique: SOLID	Detector: standard	LightSource: infrared	IRRange: MID
File: C:\Documents and settings\admin\Phu\OC-5.1kDa.smf		Acquire: Double sided F-B	Interval: 0.96

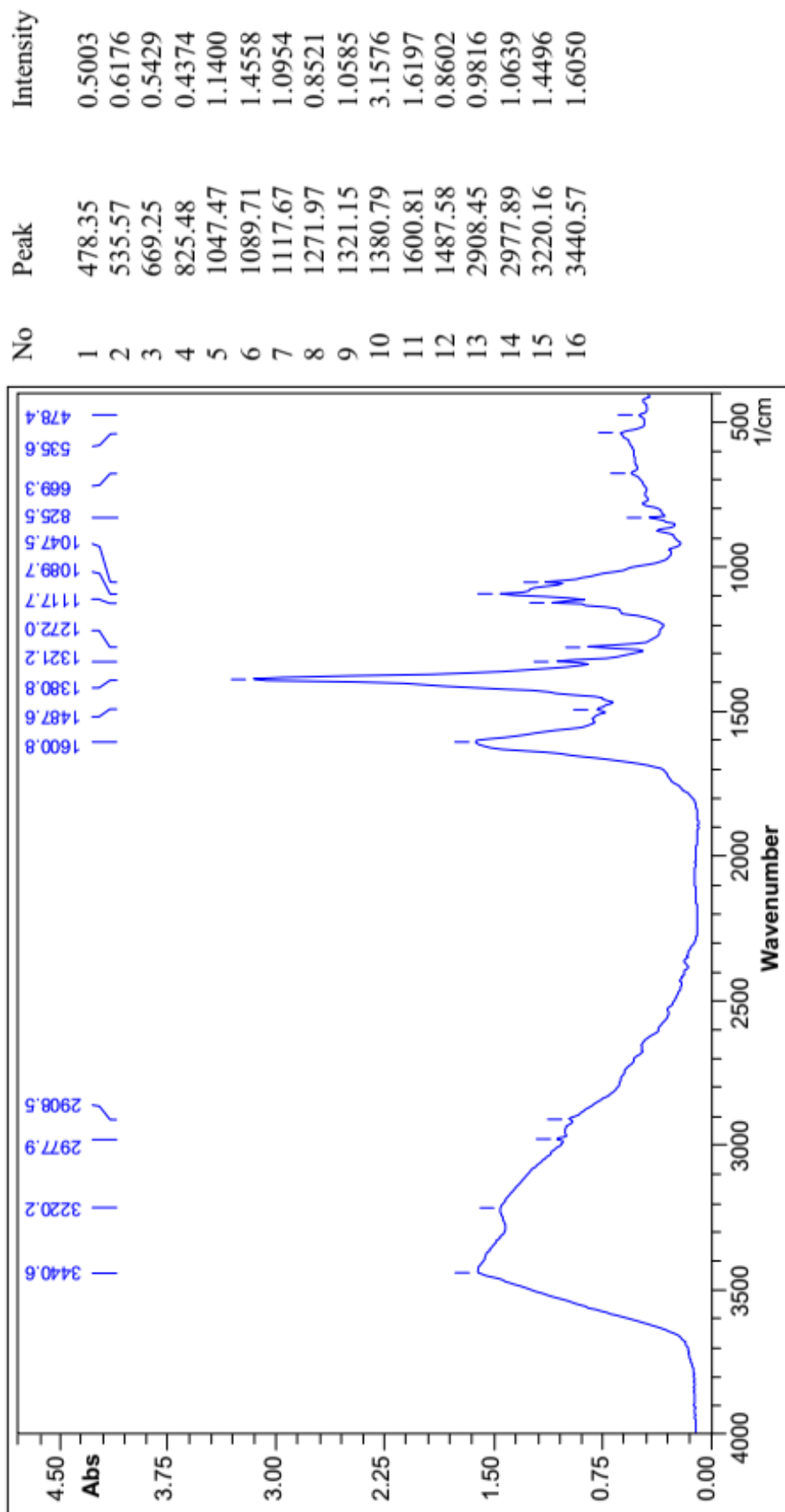
Phổ FTIR của mẫu Oligochitosan KLPT 5,1 kDa



No	Peak	Intensity
1	635.50	0.8269
2	852.64	0.5051
3	1037.33	1.7361
4	1086.81	1.9912
5	1123.36	1.6219
6	1249.89	0.8265
7	1318.66	1.2236
8	1400.19	1.8429
9	1422.26	1.0063
10	1589.23	2.2210
11	1717.49	0.9274
12	2934.49	1.2072
13	2984.64	1.2370
14	3252.72	2.0901
15	3382.91	2.1662

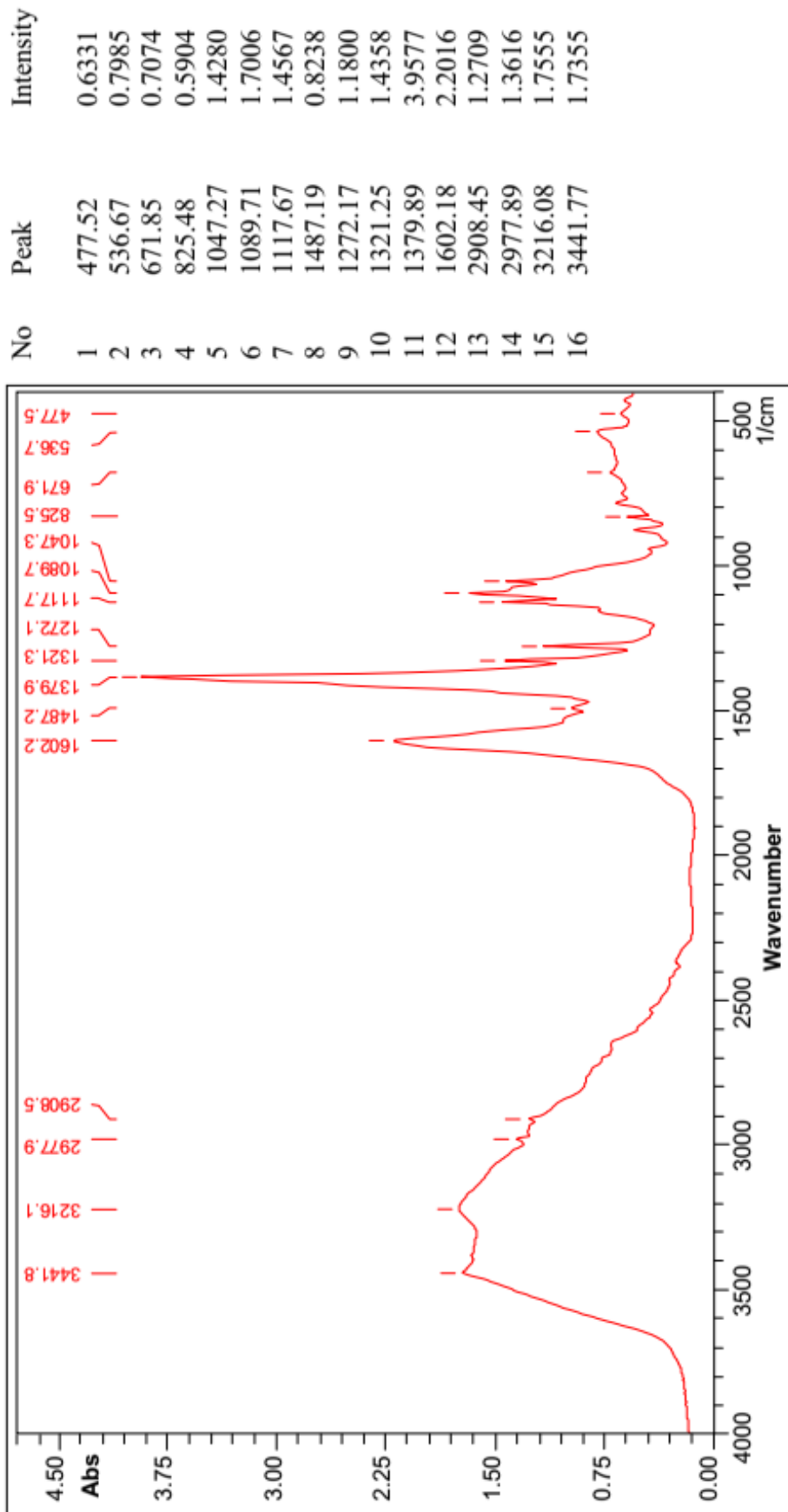
Phổ FTIR của mẫu Oligochitosan KLPT 2,5 kDa

Sample: OC-2.5 kDa (CTS2%+0.5%H2O2/ Cx-2IkGy)	Instrument: FTIR8400	IntensityMode: Absorbance	Frequency Range: 4000 - 400
Username: admin	No. of Scans: 40	Sample Scans: 6	Resolution: 2 cm ⁻¹
Technique: SOLID	Detector: standard	LightSource: infrared	IRRange: MID
File: C:\Documents and settings\admin\Phu\OC-2.5 kDa.smf		Acquire: Double sided F-B	Interval: 0.96



Sample: OC5.1-Zn (1/0.5 mol)	Instrument: FTIR8400	IntensityMode: Absorbance	Frequency Range: 4000 - 400
Username: admin	No. of Scans: 40	Sample Scans: 6	Resolution: 2 cm ⁻¹
Technique: SOLID	Detector: standard	LightSource: infrared	IRRange: MID
File: C:\Documents and settings\admin\Phu\OC5.1-Zn0.5mol.smf			Acquire: Double sided F-B
			Interval: 0.96

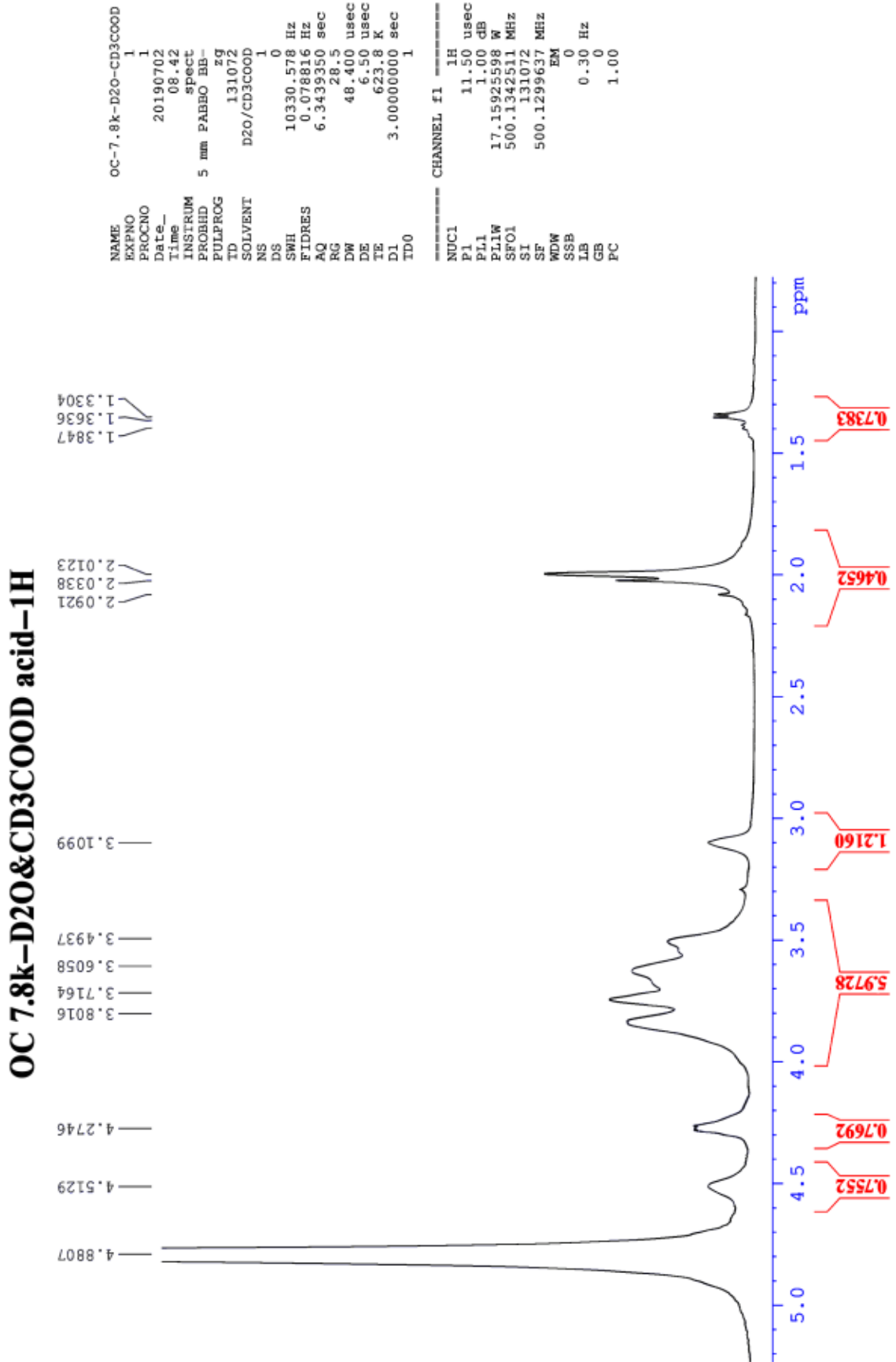
Phổ FTIR của mẫu Phức Oligochitosan-Zn²⁺
(KLPT OC 5,1 kDa, tỷ lệ mol -NH₂/Zn²⁺ 1/0,5)



Sample: OC2.5-Zn (1/0.5 mol)	Instrument: FTIR8400	IntensityMode: Absorbance	Frequency Range: 4000 - 400
Username: admin	No. of Scans: 40	Sample Scans: 6	Resolution: 2 cm ⁻¹
Technique: SOLID	Detector: standard	LightSource: infrared	IRRange: MID
File: C:\Documents and settings\admin\Phu\OC2.5-Zn0.5mol.smf		Acquire: Double sided F-B	Interval: 0.96

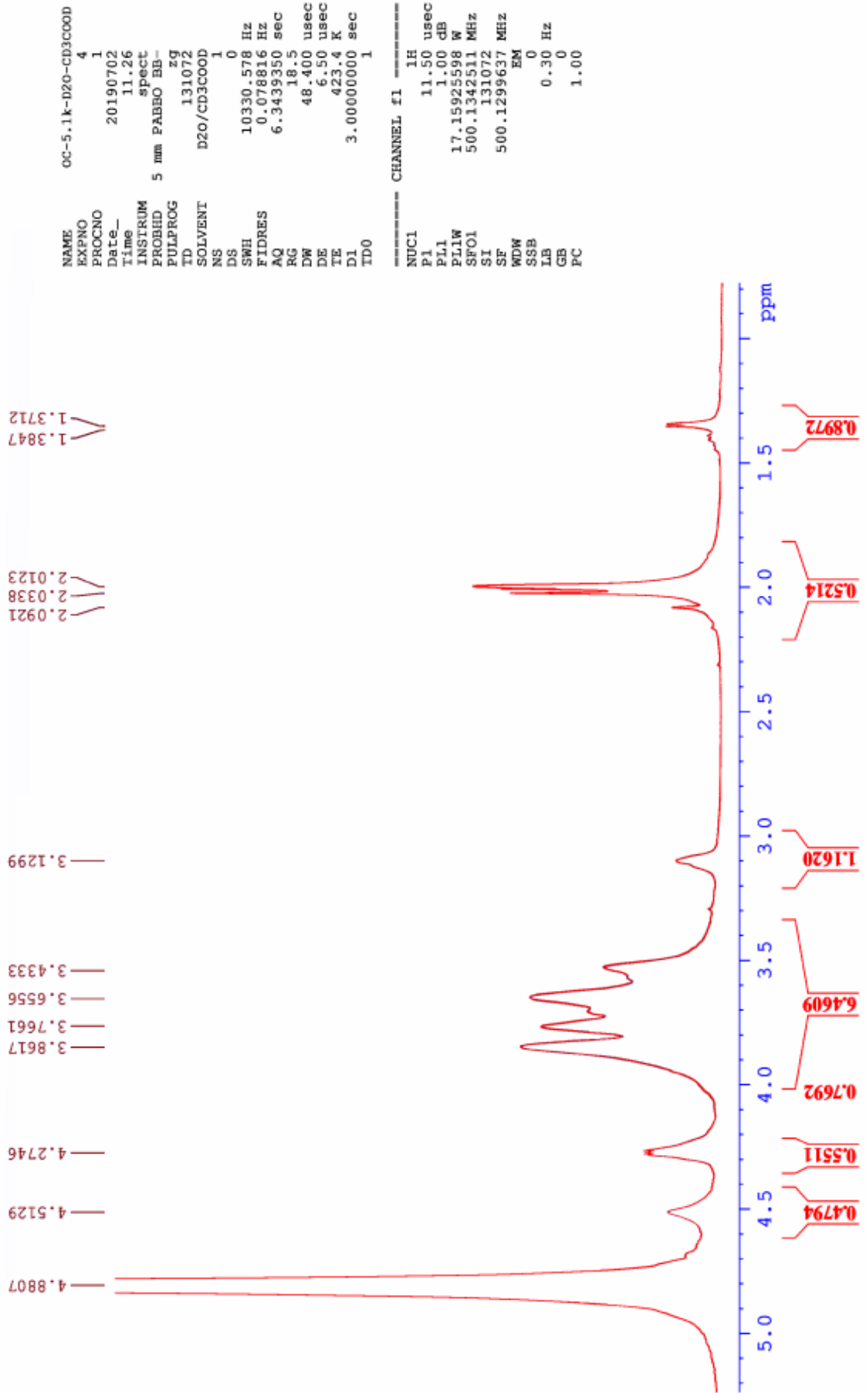
Phổ FTIR của mẫu Phức Oligochitosan-Zn²⁺
(KLPT OC 2,5 kDa, tỷ lệ mol -NH₂/Zn²⁺ 1/0,5)

Phục lục 3. Phổ ¹H NMR của oligochitosan



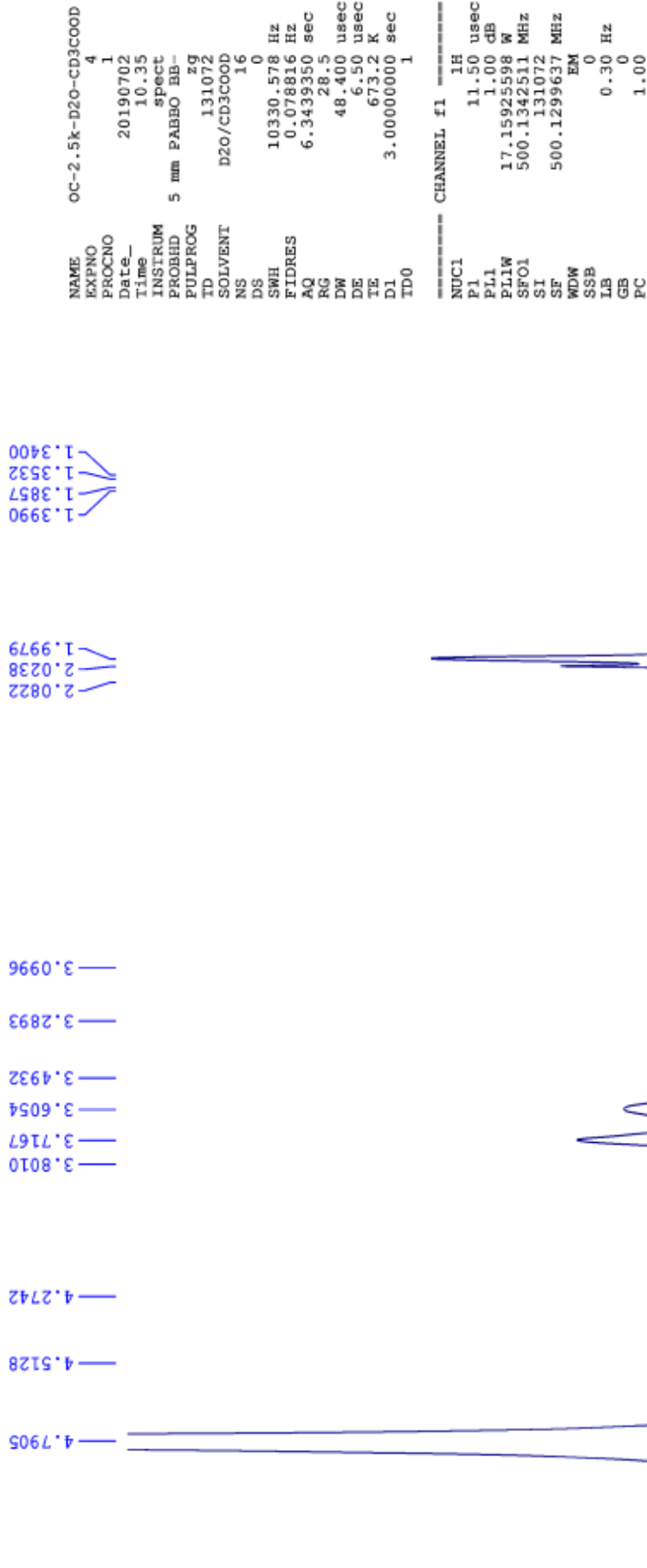
Phổ ¹H NMR của mẫu Oligochitosan KLPT 7,8 kDa

OC 5.1k-D2O&CD3COOD acid-1H



Phổ ^1H NMR của mẫu Oligochitosan KLPT 5,1 kDa

OC 2.5k -D2O&CD3COOD acid-1H




Phổ ¹H NMR của mẫu Oligochitosan KLPT 2,5 kDa

Phụ lục 5. Hàm lượng kẽm trong mẫu phức Oligochitosan-Zn²⁺

 TỔNG CỤC TIÊU CHUẨN ĐO LƯỜNG CHẤT LƯỢNG TRUNG TÂM KỸ THUẬT TIÊU CHUẨN ĐO LƯỜNG CHẤT LƯỢNG 3 QUALITY ASSURANCE & TESTING CENTER 3										
KT3-00293BHO&S	PHIẾU KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM TEST REPORT	29/04/2018 Page 01/01								
1. Tên mẫu <i>Name of sample</i>	: BỘT OC7,8 - Zn 1: 0.5 (OLIGOCHITOSAN - KẼM)									
2. Mô tả mẫu <i>Description</i>	: Mẫu thử nghiệm do khách hàng lấy mẫu, tên mẫu và thông tin về mẫu do khách hàng cung cấp./ <i>Testing sample was sampled by customer, sample name and sample information were supplied by customer.</i> Mẫu dạng lỏng, đựng trong bao nhựa. <i>The powder is contained in the plastic bag.</i>									
3. Số lượng mẫu <i>Quantity</i>	: 01									
4. Ngày nhận mẫu <i>Date of receiving</i>	: 22/04/2018									
5. Thời gian thử nghiệm <i>Testing duration</i>	: 24/03/2018 – 29/03/2018									
6. Nơi gửi mẫu <i>Customer</i>	:									
7. Kết quả thử nghiệm <i>Test result</i>	:									
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tên chỉ tiêu <i>Characteristic</i></th> <th>Phương pháp thử <i>Test method</i></th> <th>Kết quả thử nghiệm <i>Test result</i></th> <th>Giới hạn phát hiện <i>Limit of detection</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>7.1. Hàm lượng kẽm (Zn), <i>Zinc content</i></td> <td>mg/g Tham khảo/ Ref. AOAC 2016 (990.08) - (ICP-AES)</td> <td>139,9</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>	Tên chỉ tiêu <i>Characteristic</i>	Phương pháp thử <i>Test method</i>	Kết quả thử nghiệm <i>Test result</i>	Giới hạn phát hiện <i>Limit of detection</i>	7.1. Hàm lượng kẽm (Zn), <i>Zinc content</i>	mg/g Tham khảo/ Ref. AOAC 2016 (990.08) - (ICP-AES)	139,9	-	
Tên chỉ tiêu <i>Characteristic</i>	Phương pháp thử <i>Test method</i>	Kết quả thử nghiệm <i>Test result</i>	Giới hạn phát hiện <i>Limit of detection</i>							
7.1. Hàm lượng kẽm (Zn), <i>Zinc content</i>	mg/g Tham khảo/ Ref. AOAC 2016 (990.08) - (ICP-AES)	139,9	-							
TL. PHỤ TRÁCH PTN HÒA PP. HEAD OF CHEMICAL TESTING LAB.  Lê Thị Ngọc Phi		TL. GIÁM ĐỐC/ PP. DIRECTOR TRƯỞNG PHÒNG THỬ NGHIỆM/ HEAD OF TESTING LAB.  Ngô Quốc Việt								
<small>1. Các kết quả thử nghiệm ghi trong phiếu này chỉ có giá trị đối với mẫu do khách hàng gửi đến./ <i>Test results are valid for the sample submitted sample(s) only.</i> 2. Không được trích sao một phần hoặc kết quả thử nghiệm này nếu không có sự đồng ý bằng văn bản của Trung tâm Kỹ thuật 3. <i>The Test Report should not be reproduced, except in full, without the written approval of Qatest 3.</i> 3. Tên mẫu, số khách hàng được ghi theo yêu cầu của nơi gửi mẫu./ <i>Name of sample and customer are written at customer's request.</i> 4. Độ không đảm bảo do mở rộng ước lượng được tính với k = 2, mức tin cậy 95 %. Khách hàng có thể liên hệ theo địa chỉ dưới để biết thêm thông tin. <i>Estimated expanded uncertainty of measurement with k = 2, at 95 % confidence level. Please contact Qatest 3 at the below address for further information.</i> </small>										
<small>Head Office: 49 Postear, Q1, Hồ Chí Minh City, VIỆT NAM Tel: (84-28) 3829 4274 Fax: (84-28) 3829 3012 Website: www.qatest3.com.vn Testing: 7 Road 1, Biên Hòa 1 Industrial Zone, Đồng Nai Tel: (84-251) 381 6212 Fax: (84-251) 383 6298 E-mail: ts-cskh@qatest3.com.vn</small>										
Lần sửa đổi: 0		M05/1 - TTTN09								

Hàm lượng kẽm trong mẫu phức Oligochitosan-Zn²⁺(KLPT OC 7,8 kDa, tỷ lệ mol -NH₂/Zn²⁺ 1/0,5)



QUATEST 3

TỔNG CỤC TIÊU CHUẨN ĐO LƯỜNG CHẤT LƯỢNG
TRUNG TÂM KỸ THUẬT TIÊU CHUẨN ĐO LƯỜNG CHẤT LƯỢNG 3
 QUALITY ASSURANCE & TESTING CENTER 3

KT3-00293BHO8/2

PHIẾU KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM
TEST REPORT

09/03/2018
Page 01/01

1. Tên mẫu : BỘT OC5.1 – Zn 1: 0.5 (OLIGOCHITOSAN-KẼM)
Name of sample

2. Mô tả mẫu : Mẫu thử nghiệm do khách hàng lấy mẫu, tên mẫu và thông tin về mẫu do khách hàng cung cấp./ Testing sample was sampled by customer, sample name and sample information were supplied by customer.
Description
 Mẫu dạng bột, đựng trong bao nhựa.
The powder is contained in the plastic bag.

3. Số lượng mẫu : 01
Quantity

4. Ngày nhận mẫu : 28/02/2018
Date of receiving


5. Thời gian thử nghiệm : 01/03/2018 – 09/03/2018
Testing duration

6. Nơi gửi mẫu :
Customer

7. Kết quả thử nghiệm :
Test result


Tên chỉ tiêu <i>Characteristic</i>		Phương pháp thử <i>Test method</i>	Kết quả thử nghiệm <i>Test result</i>	Giới hạn phát hiện <i>Limit of detection</i>
7.1. Hàm lượng kẽm (Zn), <i>Zinc content</i>	mg/g	Tham khảo/ Ref. AOAC 2016 (990.08) - (ICP-AES)	134,2	-

TL. PHỤ TRÁCH PTN HÓA
PP. HEAD OF CHEMICAL TESTING LAB.



Lê Thị Ngọc Phi

TL. GIÁM ĐỐC/ PP. DIRECTOR
TRƯỞNG PHÒNG THỬ NGHIỆM/
HEAD OF TESTING LAB.



Ngô Quốc Việt

1. Các kết quả thử nghiệm ghi trong phiếu này chỉ có giá trị đối với mẫu do khách hàng gửi đến./ Test results are valid for the sample(s) submitted only.
 2. Không được tích sao một phần phiếu kết quả thử nghiệm này nếu không có sự đồng ý bằng văn bản của Trung tâm Kỹ thuật 3. NA: không áp dụng.
Not applicable
This Test Report shall not be reproduced, except in full, without the written approval of Quatest 3.

3. Tên mẫu, tên khách hàng được ghi theo yêu cầu của test gửi mẫu./ Name of sample and customer are written as customer's request.
 4. Độ không đảm bảo đo mở rộng ước lượng được tính với k = 2, mức tin cậy 95 %. Khách hàng có thể liên hệ theo địa chỉ dưới để biết thêm thông tin.
Estimated expanded uncertainty of measurement with k = 2, at 95 % confidence level. Please contact Quatest 3 at the below address for further information.




Head Office: 49 Pasteur, Q1, Hồ Chí Minh City, VIỆT NAM Tel: (84-28) 3829 4274 Fax: (84-28) 3829 3012 Website: www.qlatest3.com.vn
 Testing: 7 Road 1, Biên Hòa 1 Industrial Zone, Đồng Nai Tel: (84-251) 383 6212 Fax: (84-251) 383 6298 E-mail: ts-cskh@qlatest3.com.vn

Lần sửa đổi: 0

BH10 (12/2016)

M03/1 - TTTN09

Hàm lượng kẽm trong mẫu phức Oligochitosan-Zn²⁺
 (KLPT OC 5,1 kDa, tỷ lệ mol –NH₂/Zn²⁺ 1/0,5)

	TỔNG CỤC TIÊU CHUẨN ĐO LƯỜNG CHẤT LƯỢNG TRUNG TÂM KỸ THUẬT TIÊU CHUẨN ĐO LƯỜNG CHẤT LƯỢNG 3 QUALITY ASSURANCE & TESTING CENTER 3										
KT3-00293BH08/4	PHIẾU KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM TEST REPORT	29/04/2018 Page 01/01									
1. Tên mẫu <i>Name of sample</i> 2. Mô tả mẫu <i>Description</i> 3. Số lượng mẫu <i>Quantity</i> 4. Ngày nhận mẫu <i>Date of receiving</i> 5. Thời gian thử nghiệm <i>Testing duration</i> 6. Nơi gửi mẫu <i>Customer</i> 7. Kết quả thử nghiệm <i>Test result</i>	: BQT OC2.5 - Zn 1: 0.5 (OLIGOCHITOSAN - KẼM) : Mẫu thử nghiệm do khách hàng lấy mẫu, tên mẫu và thông tin về mẫu do khách hàng cung cấp./ <i>Testing sample was sampled by customer, sample name and sample information were supplied by customer.</i> Mẫu dạng lỏng, đựng trong bao nhựa. <i>The powder is contained in the plastic bag.</i> : 01 : 22/04/2018 : 24/03/2018 – 29/03/2018 : :										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 45%;">Tên chỉ tiêu <i>Characteristic</i></th> <th style="width: 15%;">Phương pháp thử <i>Test method</i></th> <th style="width: 15%;">Kết quả thử nghiệm <i>Test result</i></th> <th style="width: 25%;">Giới hạn phát hiện <i>Limit of detection</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="vertical-align: top;">7.1. Hàm lượng kẽm (Zn), <i>Zinc content</i></td> <td style="vertical-align: top;">mg/g Tham khảo/ <i>Ref.</i> AOAC 2016 (990.08) - (ICP-AES)</td> <td style="vertical-align: top; text-align: center;">105,1</td> <td style="vertical-align: top; text-align: center;">-</td> </tr> </tbody> </table>				Tên chỉ tiêu <i>Characteristic</i>	Phương pháp thử <i>Test method</i>	Kết quả thử nghiệm <i>Test result</i>	Giới hạn phát hiện <i>Limit of detection</i>	7.1. Hàm lượng kẽm (Zn), <i>Zinc content</i>	mg/g Tham khảo/ <i>Ref.</i> AOAC 2016 (990.08) - (ICP-AES)	105,1	-
Tên chỉ tiêu <i>Characteristic</i>	Phương pháp thử <i>Test method</i>	Kết quả thử nghiệm <i>Test result</i>	Giới hạn phát hiện <i>Limit of detection</i>								
7.1. Hàm lượng kẽm (Zn), <i>Zinc content</i>	mg/g Tham khảo/ <i>Ref.</i> AOAC 2016 (990.08) - (ICP-AES)	105,1	-								
TL. PHỤ TRÁCH PTN HÓA PP. HEAD OF CHEMICAL TESTING LAB.  Lê Thị Ngọc Phi	TL. GIÁM ĐỐC/ PP. DIRECTOR TRƯỞNG PHÒNG THỬ NGHIỆM/ HEAD OF TESTING LAB.  Ngô Quốc Việt										
1. Các kết quả thử nghiệm ghi trong phiếu này chỉ có giá trị đối với mẫu do khách hàng gửi đến./ <i>Test results are valid for the sample submitted sample(s) only.</i> 2. Không được trích sao một phần phiếu kết quả thử nghiệm này nếu không có sự đồng ý bằng văn bản của Trung tâm Kỹ Thuật 3. <i>This Test Report shall not be reproduced, except in full, without the written approval of Quatest 3.</i> 3. Tên mẫu, mô tả khách hàng được ghi theo yêu cầu của nơi gửi mẫu./ <i>Name of sample and customer are written at customer's request.</i> 4. Độ không đảm bảo do mở rộng ước lượng được tính với k = 2, mức tin cậy 95 %. Khách hàng có thể liên hệ theo địa chỉ dưới để biết thêm thông tin. <i>Estimated expanded uncertainty of measurement with k = 2, at 95 % confidence level. Please contact Quatest 3 or the below address for further information.</i>											
Head Office: 49 Pasteur, Q1, Hồ Chí Minh City, VIỆT NAM Tel: (84-28) 3829 4274 Fax: (84-28) 3829 3012 Website: www.quatest3.com.vn Testing: 7 Road 1, Biên Hòa 1 Industrial Zone, Đồng Nai Tel: (84-251) 383 6212 Fax: (84-251) 383 6298 E-mail: tn-cskh@quatest3.com.vn											
Lần sửa đổi: 0		BH10 (12/2016)									

Hàm lượng kẽm trong mẫu phức Oligochitosan-Zn²⁺
(KLPT OC 2,5 kDa, tỷ lệ mol -NH₂/Zn²⁺ 1/0,5)

Phụ lục 6. Khảo nghiệm hiệu ứng sinh học của oligochitosan và phức oligochitosan-Zn²⁺ đối với đậu nành trồng trên ruộng thí nghiệm.

