

Sàng lọc chủng nấm men *Saccharomyces Cerevisiae* có khả năng tích lũy kẽm cao

Nguyễn Thị Trang*, Lê Đức Mạnh, Nguyễn Thị Minh Khanh,
Trịnh Thanh Hà, Lê Thị Thắm, Phạm Thu Trang, Lê Hồng Quang

Viện Công nghiệp Thực phẩm, Bộ Công thương

Ngày nhận bài 26/4/2017; ngày chuyển phân biên 28/4/2017; ngày nhận phân biên 29/5/2017; ngày chấp nhận đăng 15/6/2017

Tóm tắt:

Được biết đến với khả năng tích lũy các nguyên tố vi lượng, nấm men có khả năng chuyển hóa kẽm từ dạng vô cơ thành dạng hữu cơ nhờ sự hình thành các mối liên kết với các đại phân tử trong tế bào. Dạng tồn tại này của kẽm trong nấm men làm tăng khả năng hấp thu kẽm của cơ thể con người. Trong nghiên cứu này, 96 chủng nấm men thuộc bộ sưu tập giống vi sinh vật đã được sàng lọc và xác định khả năng tích lũy kẽm. Các chủng nấm men được nuôi cấy trong môi trường cơ bản Saboraund có bổ sung 1000 mg/l $Zn(NO_3)_2$, ở 28°C trong 72 giờ. Kết quả cho thấy, có mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ kẽm bổ sung vào môi trường nuôi cấy và hàm lượng kẽm tích lũy trong sinh khối. Chủng nấm men *S. cerevisiae* 2049 có khả năng tích lũy kẽm hữu cơ với hàm lượng cao nhất, đạt 8916 mg/kg sinh khối. Với khả năng này, chủng *S. cerevisiae* 2049 sẽ là một chủng tiềm năng cho sản xuất nấm men giàu kẽm trên quy mô công nghiệp ở Việt Nam.

Từ khóa: Kẽm, nấm men, *Saccharomyces cerevisiae*, tích lũy kẽm.

Chỉ số phân loại: 2.8

Mở đầu

Kẽm từ lâu đã được biết đến là một trong những nguyên tố vi lượng quan trọng đối với cơ thể con người. Kẽm tham gia vào thành phần cấu trúc tế bào, hệ thống các enzyme, tác động đến hầu hết các quá trình sinh học trong cơ thể [1]. Trên thế giới, tình trạng thiếu kẽm ở trẻ em đang diễn ra rất phổ biến, đặc biệt là các nước đang phát triển với khoảng 2 tỷ người bị thiếu kẽm [2]. Nguy cơ thiếu kẽm tương đối cao và tập trung chủ yếu ở khu vực Nam Á, tiếp theo là Bắc Phi và Trung Đông. Đông Nam Á (trong đó có Việt Nam) là khu vực có nguy cơ thiếu kẽm cao đứng thứ 3 trên thế giới [3]. Chính vì vậy, việc tìm ra nguồn thực phẩm giàu kẽm bổ sung vào chế độ dinh dưỡng hàng ngày là hết sức cần thiết.

Nấm men từ lâu đã được xem là một trong các đối tượng nghiên cứu chính của ngành công nghiệp thực phẩm. Thành phần dinh dưỡng trong nấm men hết sức phong phú, có đầy đủ các yếu tố dinh dưỡng cơ bản như protein, khoáng chất và nguồn vitamin dồi dào [4]. Chúng có đặc tính dễ nuôi cấy, có thể thu được một lượng lớn sinh khối trong khoảng thời gian ngắn, đặc biệt là khả năng tích lũy các nguyên tố vi lượng khi được nuôi cấy trong môi trường tối ưu cao hơn gấp nhiều lần trong điều kiện sinh lý bình thường [5]. Hướng nghiên cứu tạo nấm men giàu kẽm ứng dụng trong sản xuất thực phẩm chức năng đã và

đang được quan tâm nghiên cứu rộng rãi trên thế giới [6-8]. Tuy nhiên ở Việt Nam, hiện có rất ít các nghiên cứu đi sâu khai thác tiềm năng này.

Để khai thác và tận dụng một cách hiệu quả nguồn giống các chủng nấm men *Sacharomyces* sẵn có trong bộ sưu tập giống vi sinh vật của Viện Công nghiệp Thực phẩm, chúng tôi đã tiến hành sàng lọc các chủng nấm men có khả năng tích lũy kẽm cao từ 96 chủng nấm men nhằm tiến tới sản xuất bột nấm men giàu kẽm trên quy mô công nghiệp. Các kết quả nghiên cứu cụ thể được trình bày dưới đây.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

96 chủng nấm men *Sacharomyces* được thu nhận từ Trung tâm Vi sinh vật công nghiệp, Viện Công nghiệp Thực phẩm.

$Zn(NO_3)_2$, glucose có nguồn gốc từ hãng Merck (Đức) và các hóa chất phân tích khác được cung cấp bởi các hãng Sigma (Mỹ), BDH (Anh).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xác định nồng độ muối kẽm phù hợp cho sàng lọc các chủng nấm men có khả năng tích lũy kẽm cao:

*Tác giả liên hệ: Email: vantrangibt@gmail.com

Screening of highly organic zinc enriched *Saccharomyces Cerevisiae*

Thi Trang Nguyen*, Duc Manh Le,
Thi Minh Khanh Nguyen, Thanh Ha Trinh,
Thi Tham Le, Thu Trang Pham, Hong Quang Le

Food Industries Research Institute, Ministry of Industry and Trade

Received 26 April 2017; accepted 15 June 2017

Abstract:

Saccharomyces has a certain enrichment ability for metal elements. It can convert inorganic zinc to organic form and can be used as a zinc carrier. Zinc that is bound to different macromolecules in yeast cells has been proven to have a better absorbability in the human body. In this study, a large number of strains (96 strains) belonging to the genus *Saccharomyces* were screened, and their ability of zinc accumulation was determined. The cultivations were performed on the Sabouraud dextrose broth medium with the addition of zinc nitrate at the concentration of 1000 mg/l, incubated at 28°C on a rotary shaker (150 rpm) for 72 hours. The results showed that there was a linear correlation between the zinc nitrate supplementation in the culture medium and the amount of zinc accumulated in the biomass. The highest organic zinc accumulation of 8916 mg/kg was observed in the strain *S. cerevisiae* 2049. It would be a promising candidate for production of zinc enriched yeasts at the industrial scale in Vietnam.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, yeast, zinc, zinc accumulation.

Classification number: 2.8

Lựa chọn một cách ngẫu nhiên 6 chủng trên tổng số 96 chủng nấm men cần được sàng lọc khả năng tích lũy kẽm. Môi trường cơ bản Sabouraud có bổ sung $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ở các nồng độ 0, 250, 500, 1000, 2000 mg/l được sử dụng để khảo sát nhằm tìm ra nồng độ muối kẽm phù hợp. Tỷ lệ tiếp giống là 10%, quá trình lên men được thực hiện trong các bình tam giác dung tích 250 ml với thể tích môi trường lên men là 100 ml, pH của môi trường được điều chỉnh tới 4,5 bằng HCl 0,1M. Các điều kiện cho quá trình lên men được tiến hành trong máy lắc 150 vòng/phút, ở 28°C trong 72 h. Sau khi nuôi cấy, tiến hành ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Rửa 3 lần sinh khối nấm men bằng nước khử ion để loại bỏ môi trường và muối kẽm bám trên bề mặt tế bào [7].

Tốc độ phát triển của nấm men được tiến hành đánh giá trên hệ thống máy quang phổ bước sóng 620 nm. Ở thời điểm cuối thí nghiệm, ly tâm dịch sau lên men, rửa sinh khối và thu cặn tế bào. Thu sinh khối khô bằng phương pháp sấy 2 pha, đầu tiên sấy ở điều kiện 60°C trong 2 h, sau đó kết thúc quá trình sấy ở 105°C đến khối lượng không đổi. Sinh khối tế bào được tính bằng số gram chất khô/100 ml môi trường [7].

Phương pháp tách hợp chất kẽm hữu cơ từ sinh khối nấm men giàu kẽm:

Bổ sung nước khử ion vào sinh khối khô, chỉnh pH tới 11 bằng dung dịch NaOH 1N. Khuấy trong 15 phút, sau đó chỉnh pH về 7. Làm ẩm dung dịch trong 30 phút ở 65°C và quan sát sự phá vỡ tế bào nấm men bằng kính hiển vi, ly tâm ở 6000 vòng trong 10 phút. Cặn có chứa kẽm hữu cơ, trong khi phần dung dịch có chứa cả hai loại kẽm dạng vô cơ và hữu cơ. Để kết tủa tiếp kẽm hữu cơ, NaCl (100 g/l) được thêm vào dung dịch, ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 10 phút. Phần kết tủa chứa kẽm hữu cơ, còn phần dung dịch chứa kẽm vô cơ. Thu kết tủa và sử dụng phương pháp đo phổ hấp thụ nguyên tử (AAS) để xác định hàm lượng kẽm hữu cơ trong mẫu [9].

Phương pháp đo phổ hấp thụ nguyên tử (AAS):

Mẫu phân tích được xử lý bằng phương pháp Demirci [10]. Cho 0,1 g sinh khối nấm men vào bình định mức 300 ml, thêm 5 ml dung dịch acid nitric. Sau khi kết thúc phản ứng thêm 2 ml dung dịch acid sulphuric, tiếp tục làm nóng và duy trì phản ứng oxy hóa bằng cách nhỏ từ từ dung dịch acid nitric đến khi dung dịch mất màu hoàn toàn. Quá trình gia nhiệt được tiếp tục cho đến khi lượng acid bay hơi hết. Lượng chất khô được hòa loãng với 20 ml nước cất, tiến hành lọc vào bình định mức 50 ml và hòa loãng mẫu đã xử lý trong nước cất. Mẫu sau khi xử lý được đưa vào hệ thống máy đo phổ hấp thụ nguyên tử và tiến hành phân tích hàm lượng kẽm ở bước sóng 213,9 nm.

Phương pháp xử lý số liệu:

Các số liệu được xử lý trên Excel, thuật toán thống kê Student t'test, Fisher test và phương pháp phân tích phương sai một nhân tố ngẫu nhiên (one way ANOVA). Nếu $p < 0,05$ được coi là sai khác có ý nghĩa, nếu $p > 0,05$ sự sai khác là không có ý nghĩa thống kê.

Kết quả và thảo luận

Kết quả lựa chọn nồng độ muối kẽm phù hợp cho quá trình sàng lọc chủng nấm men tích lũy kẽm

Theo quan điểm của Agate, đặc tính quan trọng quyết định khả năng hấp thu kim loại của vi sinh vật là tính kháng kim loại của các sinh vật đó [11]. Hầu hết các chủng vi sinh vật có khả năng kháng kim loại tốt đều có khả năng liên kết hiệu quả với kim loại đó [12]. Do đó, việc tuyển chọn, phân lập các chủng vi sinh vật có khả năng kháng kim loại chính là bước quan trọng để tìm ra các chủng có khả năng tích lũy kim loại với hàm lượng cao.

Các chủng nấm men *S. cerevisiae* được biết đến có khả năng tích lũy các kim loại, trong đó có nguyên tố vi lượng kẽm, mỗi chủng nấm men lại có khả năng đề kháng với kẽm ở các nồng độ khác nhau. Để sàng lọc và chọn được chủng nấm men có khả năng tích lũy kẽm cao một cách nhanh và hiệu quả nhất thì việc tìm ra nồng độ muối kẽm phù hợp cho quá trình sàng lọc là vấn đề tiên quyết. Chính vì vậy, việc khảo sát sự ảnh hưởng của các nồng độ $Zn(NO_3)_2$ tới mối tương quan của hai nhân tố được nghiên cứu là hàm lượng kẽm tích lũy trong sinh khối và khối lượng sinh khối nấm men giàu kẽm thu được là hết sức cần thiết.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ $Zn(NO_3)_2$ tới hàm lượng kẽm trong sinh khối khô của các chủng nấm men (mg/kg).

Chủng nấm men	Nồng độ $Zn(NO_3)_2$ bổ sung vào môi trường nuôi cấy (mg/l)				
	0	250	500	1000	2000
<i>S. cerevisiae</i> 1041	320 $\pm$ 18	678 $\pm$ 28	996 $\pm$ 237	1800 $\pm$ 229	3567 $\pm$ 237
<i>S. cerevisiae</i> 1043	318 $\pm$ 19	558 $\pm$ 47	855 $\pm$ 203	1055 $\pm$ 216	2965 $\pm$ 203
<i>S. cerevisiae</i> 1062	332 $\pm$ 20	349 $\pm$ 35	547 $\pm$ 24	556 $\pm$ 27	962 $\pm$ 28
<i>S. cerevisiae</i> 2049	365 $\pm$ 21	1657 $\pm$ 209	4982 $\pm$ 294	8916 $\pm$ 204	12936 $\pm$ 279
<i>S. cerevisiae</i> 2050	336 $\pm$ 19	1084 $\pm$ 164	2538 $\pm$ 178	3501 $\pm$ 198	5597 $\pm$ 173
<i>S. cerevisiae</i> 2075	338 $\pm$ 23	1274 $\pm$ 223	2918 $\pm$ 228	5891 $\pm$ 294	7891 $\pm$ 211

Ghi chú: mức sai khác $p < 0,05$; giá trị $\pm$ là độ lệch chuẩn, $n = 3$.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ $Zn(NO_3)_2$ tới khối lượng sinh khối khô của các chủng nấm men (g/100 ml).

Chủng nấm men	Nồng độ $Zn(NO_3)_2$ bổ sung vào môi trường nuôi cấy (mg/l)				
	0	250	500	1000	2000
<i>S. cerevisiae</i> 1041	0,92 $\pm$ 0,09	0,90 $\pm$ 0,11	0,88 $\pm$ 0,09	0,65 $\pm$ 0,10	0,12 $\pm$ 0,01
<i>S. cerevisiae</i> 1043	0,91 $\pm$ 0,09	0,91 $\pm$ 0,21	0,89 $\pm$ 0,19	0,78 $\pm$ 0,10	0,11 $\pm$ 0,01
<i>S. cerevisiae</i> 1060	0,93 $\pm$ 0,12	0,93 $\pm$ 0,19	0,92 $\pm$ 0,18	0,88 $\pm$ 0,10	0,11 $\pm$ 0,05
<i>S. cerevisiae</i> 2049	0,98 $\pm$ 0,11	0,98 $\pm$ 0,10	0,98 $\pm$ 0,12	0,94 $\pm$ 0,11	0,14 $\pm$ 0,04
<i>S. cerevisiae</i> 2050	0,96 $\pm$ 0,12	0,96 $\pm$ 0,10	0,96 $\pm$ 0,10	0,91 $\pm$ 0,09	0,10 $\pm$ 0,03
<i>S. cerevisiae</i> 2075	0,98 $\pm$ 0,12	0,98 $\pm$ 0,09	0,98 $\pm$ 0,12	0,95 $\pm$ 0,13	0,13 $\pm$ 0,04

Ghi chú: mức sai khác $p < 0,05$; giá trị $\pm$ là độ lệch chuẩn, $n = 3$.

Có thể nhận thấy, có mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ kẽm bổ sung vào môi trường nuôi cấy và hàm lượng kẽm tích lũy trong sinh khối của các chủng nấm men được nghiên cứu (bảng 1). Nồng độ kẽm trong môi trường càng cao thì hàm lượng kẽm tích lũy trong sinh khối càng nhiều ($p < 0,05$). Ở nồng độ $Zn(NO_3)_2$ là 1000 mg/l hàm lượng kẽm tích lũy trong sinh khối của các chủng nấm men có sự phân cấp và khác biệt nhau rõ rệt.

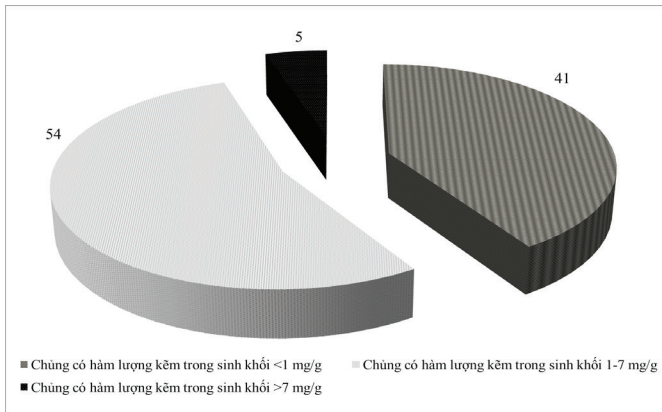
Tuy nhiên, khả năng đề kháng với các nồng độ kẽm ngày càng cao ở mỗi chủng nấm men là khác nhau (bảng 2). Cụ thể trên chủng *S. cerevisiae* 1041 thể hiện khả năng sinh trưởng phát triển kém thông qua sự sụt giảm khối lượng sinh khối ở nồng độ kẽm là 250 mg/l. Trong khi đó, ở *S. cerevisiae* 2049 nồng độ kẽm trong môi trường nuôi cấy phải lên tới 1000 mg/l mới thể hiện sự ức chế sinh trưởng ($p < 0,05$). Với nồng độ kẽm là 2000 mg/l hầu hết các chủng được khảo sát đều không có khả năng đề kháng và sinh trưởng trong điều kiện này. Chúng tôi nhận thấy, ở nồng độ kẽm 1000 mg/l là vừa đủ để phát hiện khả năng tích kẽm của các chủng nấm men nên mức bổ sung kẽm này được lựa chọn làm nồng độ chuẩn cho việc tìm kiếm và sàng lọc các chủng nấm men có khả năng tích kẽm hữu cơ với hàm lượng cao.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi về ảnh hưởng của việc bổ sung muối kẽm vào môi trường nuôi cấy tới hàm lượng kẽm tích lũy và khối lượng sinh khối thu được cũng phù hợp với các kết quả nghiên cứu khác trên thế giới [13]. Theo Eide và cộng sự, kẽm là một nguyên tố vi lượng thiết yếu, cần thiết để duy trì chức năng của hơn 3% hệ protein nấm men [14]. Mặc dù ở điều kiện sinh lý, kẽm không có hoạt tính oxy hóa khử nhưng lượng kẽm dư thừa có thể gây độc cho tế bào. Độc tính của kẽm biểu hiện thông qua liên kết trung gian của cation với các vị trí không tương thích trên phân tử protein hoặc các cofactor. Kẽm dư thừa có thể gây trở ngại cho hoạt động của enzyme aconitase ty thể làm giảm hô hấp, tế bào sinh trưởng phát triển chậm [15].

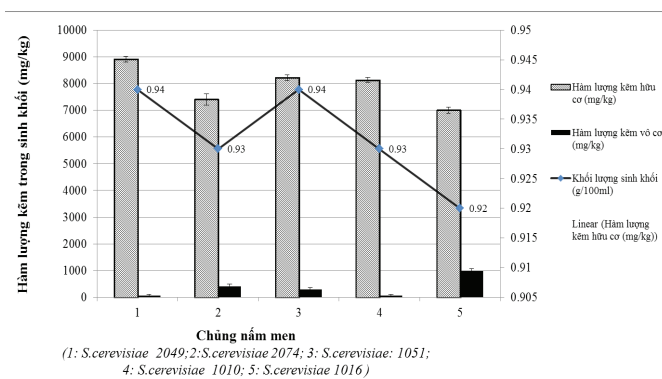
Kết quả sàng lọc chủng nấm men tích lũy kẽm hữu cơ cao

96 chủng nấm men *Sacharomyces* thu nhận từ Trung tâm Vi sinh vật công nghiệp, Viện Công nghiệp Thực phẩm được sàng lọc và tìm kiếm khả năng tích lũy kẽm trên môi trường Saboraund có bổ sung $Zn(NO_3)_2$ ở nồng độ 1000 mg/l. Tỷ lệ tiếp giống là 10%, pH của môi trường được điều chỉnh tới 4,5 bằng HCl 0,1M, quá trình lên men được tiến hành trong máy lắc 150 vòng/phút, ở 28°C trong 72 h. Kết quả cho thấy, trong tổng số 96 chủng nấm men được nghiên cứu có 39 chủng thể hiện khả năng tích lũy kẽm thấp (dưới 1 mg/g sinh khối khô), chiếm tỷ lệ 41%, 52 chủng tích lũy kẽm trong khoảng từ 1-7 mg/g sinh khối,

chiếm tỷ lệ 54% và 5 chủng có khả năng tích lũy kẽm với hàm lượng cao trên 7 mg/g sinh khối, chiếm tỷ lệ 5% (hình 1). Các chủng nấm men này được tiếp tục sàng lọc phân tích thành phần kẽm có trong sinh khối.



Hình 1. Khả năng tích lũy kẽm của 96 chủng nấm men được sàng lọc.



Hình 2. Dạng kẽm tích lũy trong các chủng nấm men chứa hàm lượng kẽm cao.

Kết quả hình 2 cho thấy, dạng kẽm tồn tại trong sinh khối 5 chủng nấm men giàu kẽm được nghiên cứu phần lớn đều ở dạng hữu cơ. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Azad và cộng sự.

S. cerevisiae 2049 cho khả năng tích lũy kẽm cao nhất và khả năng chịu kẽm tốt trong điều kiện bổ sung muối kẽm với nồng độ cao thể hiện ở lượng sinh khối đạt cao nhất trong các chủng được nghiên cứu nên được sử dụng cho nghiên cứu nhằm tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy, tiến tới sản xuất nấm men giàu kẽm quy mô công nghiệp.

Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy nồng độ muối kẽm bổ sung vào môi trường nuôi cấy tỷ lệ thuận với hàm lượng kẽm tích lũy trong sinh khối nấm men. Nồng độ 1000 mg/l muối kẽm khi bổ sung vào môi trường nuôi

cấy là nồng độ phù hợp nhất cho quá trình sàng lọc chủng nấm men tích lũy kẽm cao.

Chủng nấm men *S. cerevisiae* 2049 cho khả năng tích lũy kẽm với hàm lượng cao, đạt 8916 mg/kg, khả năng đề kháng tốt với kẽm đã được lựa chọn và tiến tới nghiên cứu lựa chọn các điều kiện phù hợp để sản xuất nấm men giàu kẽm trên quy mô lớn.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ về kinh phí của đề tài nghiên cứu thuộc nhiệm vụ khoa học và công nghệ cấp quốc gia: “Nghiên cứu công nghệ sản xuất bột nấm men giàu kẽm hữu cơ làm nguyên liệu sản xuất thực phẩm chức năng”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R.S. Mac Donald (2000), “The role of zinc in growth and cell proliferation”, *J. Nutr.*, **130**(5), pp.1500-1508.
- [2] A.S. Prasad (2003), “Zinc deficiency: Has been known of for 40 years but ignored by global health organisations”, *BMJ*, **326**(7386), pp.409-410.
- [3] N.F. Kreb (1998), “Zinc requirements and zinc intakes of breast - fed infants. Complementary feeding of young children in developing countries: a review of current scientific knowledge”, *Am. J. Clin. Nutr.*, **43**, pp.288-292.
- [4] J. Mrvic, D. Stanzer, V. Stehlik-Tomas, D. Skevin, S. Grba (2007), “Optimization of bioprocess for production of copper - enriched biomass of industrially important microorganism *Saccharomyces cerevisiae*”, *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, pp.331-337.
- [5] V. Stehlik-Thomas, S. Grba, D. Stanzer, N. Vahcic, V.G. Zetic (2003), “Uptake of iron by yeast cells and its impact on biomass production”, *Acta Aliment.*, **32**, pp.279-287.
- [6] Z.H. Wang, J. Zhang, T. Su, Z.H. Guan, M. Ji (2011), “Screening of iron and zinc - enriched yeast strain and optimization of cultivation conditions”, *Preparative Biochemistry & amp Biotechnology*, **41**(3), pp.278-286.
- [7] S.K. Azad, F. Shariatmadari, M. Amir, K. Torshizi (2014), “Production of zinc - enriched biomass of *Saccharomyces cerevisiae*”, *J. Elem.*, pp.313-326.
- [8] S. Šillerová, B. Lavová, D. Urmínská, A. Poláková, A. Vollmannová, L. Harangozo (2012), “Preparation of zinc enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by cultivation with different zinc salts”, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, **1**, pp.689-695.
- [9] C.B.S. Roepcke, L.P.S. Vandenberghe, C.R. Soccol (2011), “Optimized production of *Pichia guilliermondii* biomass with zinc accumulation by fermentation”, *Animal Feed Science and Technology*, **163**, pp.33-42.
- [10] A. Demirci, A.L. Pometto (2000), “Enhanced organically bound chromium yeast production”, *J. Arg. Food Chem.*, **48**(2), pp.531-536.
- [11] A.D. Agate, S. Roussos, C.R. Soccol, A. Pandey, C. Augur (2003), “Bioremediation and biobeneficiation of metal”, *New Horizons in Biotechnology*, pp.215-220.
- [12] A. Malik (2004), “Metal bioremediation through growing cells”, *Environ. Int.*, **30**, pp.261-278.
- [13] Z.H. Wang, J. Zhang, T. Su, Z.H. Guan, M. Ji (2014), “Screening of iron and zinc - enriched yeast strain and optimization of cultivation conditions”, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, **41**(3), pp.278-286.
- [14] D. Eide (1997), “Molecular biology of iron and zinc uptake in eukaryotes”, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, pp.573-577.
- [15] L.C. Costello, Y. Liu, R.B. Franklin, M.C. Kennedy (1997), “Zinc inhibition of mitochondrial aconitase and its importance in citrate metabolism of prostate epithelial cells”, *J. Biol. Chem.*, **272**, pp.28875-28881.