

## ***Investigating the L-asparaginase Production in the Yeast *Yarrowia Lipolytica****

**Farshad Darvishi \***

Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Science, University of Maragheh, Maragheh, Iran., f.darvishi@ymail.com

**Fereshteh Shamsi**

MSc, Department of Microbiology, Faculty of Science, University of Maragheh, Maragheh, Iran, fereshte.shamsi@gmail.com

### **Abstract**

**Introduction:** L-Asparaginase catalyzes the hydrolysis of L-asparagine to L-aspartic acid and ammonia. This enzyme is used for the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia, melanosarcoma and lymphosarcoma. It is also used in the production of acrylamide-free foods. Considering the important applications of this enzyme, the aim of this study was to introduce a new microbial source for the production of eukaryotic L-asparaginase.

**Materials and Methods:** The quality and quantity production of L-asparaginase was investigated in four strains of yeast *Yarrowia lipolytica*. The quality assessment of L-asparaginase production was done on asparagine minimal agar. Quantitative assay of the enzyme was done in Czapek Dox's medium by spectrophotometric method using Nessler's reagent.

**Results:** All of four strains show that they are able to produce asparaginase making a purple halo around the colony. *Y. lipolytica* DSM3286, DSM70562, DSM3218 and CBS6303 were produced 17/14, 11, 6/98 and 5/61 U/mL of asparaginase in Czapek Dox's medium after 24 h, respectively.

**Discussion and Conclusion:** *Y. lipolytica* DSM3286 was selected as the best asparaginase producer strain with the largest halo and the highest asparaginase production. The *Y. lipolytica* could be used as a potential source of L-asparaginase production.

**Key words:** *Yarrowia Lipolytica*, Asparaginase, Anticancer Drug, Production.

---

\* Corresponding author

**Received:** June 02, 2018 / **Accepted:** August 20, 2018

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها  
سال هفتم، شماره ۲۷، پاییز ۱۳۹۷، صفحه ۷۹-۷۳  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۲۰

## بررسی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز در مخمر *یارروویا لیپولیتیکا*

**فرشاد درویشی\***: دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه مراغه، ایران، f.darvishi@ymail.com  
**فرشته شمسی**: کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه مراغه، ایران، fereshte.shamsi@gmail.com

### چکیده

**مقدمه:** آنزیم ال-آسپاراژیناز تجزیه ال-آسپاراژین را به ال-آسپاراتیک اسید و آمونیاک تسریع می‌کند. این آنزیم در درمان بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد، ملانوسارکوما و لنفوما استفاده می‌شود و در تولید مواد غذایی بدون آکریل آمید کاربرد دارد. با توجه به کاربردهای مهم این آنزیم، هدف پژوهش حاضر معرفی منبع جدید میکروبی برای تولید ال-آسپاراژیناز یوکاریوتی است.

**مواد و روش‌ها:** تولید کمی و کیفی ال-آسپاراژیناز در چهار سویه مخمر *یارروویا لیپولیتیکا* بررسی شد. بررسی کیفی تولید ال-آسپاراژیناز روی محیط کشت حداقل آسپاراژین آگار و سنجش کمی ال-آسپاراژیناز در محیط کشت سیزپکس داکس به روش طیف نورسنجی با معرف نسلر انجام شد.

**نتایج:** هر چهار سویه با ایجاد هاله ارغوانی رنگ اطراف کلنی نشان دادند قادر به تولید آنزیم آسپاراژیناز هستند. پس از ۲۴ ساعت، سویه‌های DSM3286، DSM70562، DSM3218 و CBS6303 به ترتیب ۱۷/۱۴، ۱۱، ۶/۹۸ و ۵/۶۱ واحد در میلی‌لیتر آسپاراژیناز در محیط کشت سیزپکس داکس تولید کردند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** *یارروویا لیپولیتیکا* سویه DSM 3286 با ایجاد بیشترین قطر هاله و تولید بیشترین مقدار آنزیم آسپاراژیناز بهترین سویه تولیدکننده آسپاراژیناز انتخاب شد. امکان استفاده از مخمر *یارروویا لیپولیتیکا* به شکل منبع بالقوه‌ای از ال-آسپاراژیناز وجود دارد.

**واژه‌های کلیدی:** مخمر *یارروویا لیپولیتیکا*، آسپاراژیناز، داروی ضد سرطان، تولید

\* نویسنده مسئول مکاتبات

## مقدمه

آنزیم ال-آسپاراژیناز (EC.3.5.1.1; asparagine amidohydrolase) تجزیه ال-آسپاراژین به ال-آسپاراتیک‌اسید و آمونیاک را تسریع می‌کند (۱). آسپاراژیناز با ازبین‌بردن آسپاراژین موجود در خون باعث کاهش دسترسی سلول‌های سرطانی به این آمینواسید می‌شود و در نتیجه، این سلول‌ها در اثر ناتوانی در ساخت آسپاراژین دچار مرگ سلولی می‌شوند و از بین می‌روند (۲). آسپاراژین آمینواسیدی غیرضروری برای بدن است که به‌واسطه مسیرهای متابولیکی مرکزی در بدن انسان تولید می‌شود و به حضور آن در غذا نیازی نیست؛ برخلاف سلول‌های طبیعی، سلول‌های سرطانی به‌علت نداشتن فعالیت آسپاراژین‌سنتتازی قادر به سنتز ال-آسپاراژین نیستند. تزریق داخل وریدی آسپاراژیناز موجب کاهش منابع آسپاراژین در بدن می‌شود و سلول‌های سرطانی را در شرایط فقر آسپاراژین قرار می‌دهد؛ بنابراین رشد آنها متوقف می‌شود و یا حتی مرگ آنها اتفاق می‌افتد. آسپاراژیناز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های درمانی از نظر فناوری و زیست‌پزشکی است که در درمان انواع لوسمی‌ها مانند لوسمی لنفوبلاستیک حاد، لنفوسارکوما، لنفوما، هوجکین، لنفوما غیرهوجکین و ملانوسارکوما به‌ویژه در کودکان و نوجوانان به کار می‌رود (۳).

آسپاراژیناز با ازبین‌بردن آکریل‌آمیدی که در اثر حرارت زیاد از آسپاراژین موجود در غذاهای نشاسته‌دار ایجاد می‌شود خطر ابتلا به سرطان را کاهش می‌دهد. آکریل‌آمید ترکیب بالقوه سرطان‌زایی است که چنانچه وارد بدن شود تجزیه می‌شود و گلاسید‌آمید تولید می‌کند. گلاسید‌آمید سبب ایجاد جهش در DNA سلول و بروز سرطان می‌شود. هنگامی که غذاهای نشاسته‌دار

مانند غلات، سیب‌زمینی، نان، ذرت و پاستا در دمای بیشتر از ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گیرند و یا گریل شوند از آسپاراژین موجود در آنها آکریل‌آمید به وجود می‌آید؛ در نتیجه، استفاده از ال-آسپاراژیناز در صنایع غذایی و تولید مواد غذایی بدون آکریل‌آمید مفید خواهد بود (۴ و ۵). پژوهشگران در سال ۱۹۵۳ نشان دادند سرم خوکچه هندی دارای ویژگی ضدتوموری است (۶) و سپس دریافتند ویژگی ضدتوموری سرم خوکچه هندی ناشی از آنزیم آسپاراژیناز است (۷). در پژوهش‌های بعدی مشخص شد آنزیم آسپاراژیناز خالص‌شده از باکتری *اشریشیا کلی* مشابه سرم خوکچه هندی دارای فعالیت ضدتوموری است. ایمادا و همکاران در سال ۱۹۷۳ ریزموجودات بسیاری را از نظر وجود آنزیم آسپاراژیناز و گلوتامیناز بررسی کردند و وجود هر دو آنزیم را در تعدادی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها نشان دادند (۸).

هاریسون در سال ۱۹۲۸ برای نخستین بار مخمر *یارروویا لیپولیتیکا* را شناسایی کرد. بیشترین دمای رشد این مخمر ۳۲ تا ۳۴ درجه سانتی‌گراد است؛ از این رو برای انسان بیماری‌زا نیست و سازمان غذا و داروی امریکا (FDA) آن را ریزموجود ایمنی تأیید کرده است که کاربردهای بسیار متفاوتی در فناوری دارد (۹ و ۱۰). مخمر *یارروویا لیپولیتیکا* منابع مختلف کربن از جمله هیدروکربن‌ها، اسیدهای چرب، الکل‌ها و استات را مصرف می‌کند و به‌علت چربی‌دوست بودن به‌آسانی از منابع مختلف لیپیدی و هیدروکربنی جدا می‌شود. این مخمر به‌علت قابلیت تولید آنزیم‌ها و متابولیت‌های مختلف از جمله سیتریک‌اسید، لیپازها و استرازها مورد توجه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته است (۱۱) و (۱۲).

**آماده‌سازی مایع تلقیح:** فعال‌سازی سویه‌ها با کشت روی محیط YPD انجام شد. پس از گرماگذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد، یک کلنی (مایع تلقیح) به ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط YPD مایع بدون آگار انتقال داده شد. سپس ارلن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند (۱۵).

**محیط سنجش تولید آسپاراژیناز:** محیط سیزپکس داکس محیط تولید آنزیم آسپاراژیناز است که برای تولید آسپاراژیناز در ارلن استفاده شد. ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت تولید حاوی ۲ گرم درلیتر گلوکز، ۱۰ گرم درلیتر آسپاراژین، ۱/۲۵ گرم درلیتر فسفات هیدروژن دی‌پتاسیم، ۰/۵۲ گرم درلیتر کلراید پتاسیم، ۰/۰۳ گرم درلیتر سولفات آهن، ۰/۰۵ گرم درلیتر سولفات روی در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری تهیه شد. سپس در شرایط استریل، ۱ درصد مایع تلقیح به محیط تولید منتقل شد و میزان رشد مخمرها پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. میزان تولید آسپاراژیناز به روش رنگ‌سنجی بر پایه تغییر رنگ آمونیاک بر اساس روش ایمادا و با دستگاه اسپکتروفتومتر سنجیده شد (۸ و ۱۴).

**اندازگیری رشد و فعالیت آنزیمی:** لام نئوبار برای بررسی رشد و شمارش تعداد سلول‌های مخمر استفاده شد. روش تیتراسیون برای سنجش فعالیت آسپاراژیناز به کار رفت. در مرحله نخست، از محیط‌های کشت مخمر نمونه برداری شد و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۰/۵ میلی‌لیتر محلول رویی به لوله‌های آزمایش حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر بافر تریس با اسیدیته حدود ۸/۲، ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر آل-آسپاراژین اضافه و مخلوط شد و نمونه‌ها

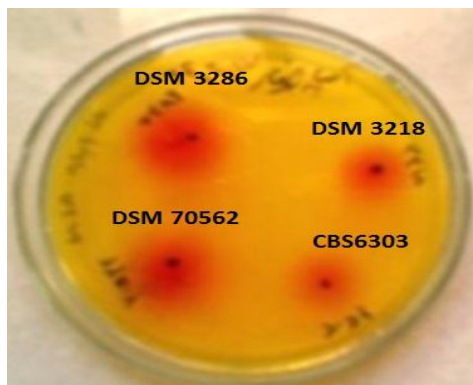
باتوجه به اهمیت و کاربرد روزافزون آنزیم یادشده، نخستین گام برای تولید انبوه آسپاراژیناز یافتن ریزموجودات جدید با توان تولید زیاد و آثار سمیت سلولی کمتر است. از مخمر یاروویا لیپولیتیکا می‌توان برای دستیابی به آسپاراژیناز جدید با منشأ یوکاریوتی و دارای آثار نامطلوب کمتر و همچنین مقرون به صرفه کردن تولید آنزیم برای درمان بیماران مبتلا به سرطان استفاده کرد.

## مواد و روش‌ها

**سویه‌های میکروبی:** در پژوهش حاضر از چهار سویه استاندارد مخمر یاروویا لیپولیتیکا CBS، DSM 3286، DSM 70562، 6303 و DSM 3218 استفاده شد که از مجموعه DSMZ آلمان تهیه شده بودند. از محیط کشت YPD حاوی ۲۰ گرم درلیتر گلوکز، ۲۰ گرم درلیتر پیتون، ۱۰ گرم درلیتر عصاره مخمر و ۱۷ گرم درلیتر آگار برای کشت این مخمر در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد به شکل جامد و مایع استفاده شد و نمونه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۳).

**محیط سنجش کیفی تولید آسپاراژیناز:** برای شناسایی مخمرهای تولیدکننده آسپاراژیناز بر اساس روش سنجش سریع از محیط حداقل آسپاراژین آگار حاوی ۱ درصد آسپاراژین، ۰/۰۵ درصد سولفات منیزیم، ۰/۰۵ درصد کلراید پتاسیم، ۰/۰۲ درصد کلراید سدیم، ۰/۰۱۲ درصد فنل رد (شناساگر اسیدیته) و ۱/۵ درصد آگار استفاده شد. مخمرهایی که قادر به تولید آنزیم باشند در محیط آمونیاک تولید می‌کنند، اسیدیته را تغییر می‌دهند و هاله ارغوانی‌رنگ اطراف کلنی ایجاد می‌کنند. قطر هاله‌های ایجاد شده پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد (۱۴).

نسبت قطر هاله تولید آنزیم به قطر کلنی سویه DSM 3286 بیشترین میزان را داشت.



شکل ۱- تغییر رنگ محیط کشت حداقل آسپاراژین آگار حاوی معرف فنلرد در اثر تولید آنزیم خارج سلولی آسپاراژیناز توسط سویه‌های مختلف مخمر *یارروویا لیپولیتیکا* پس از ۲۴ ساعت. نسبت قطر هاله تولید آنزیم به قطر کلنی سویه‌ها به ترتیب میزان نسبت عبارتست از: DSM 3286، DSM 70562، DSM 3218 و 6303 CBS.

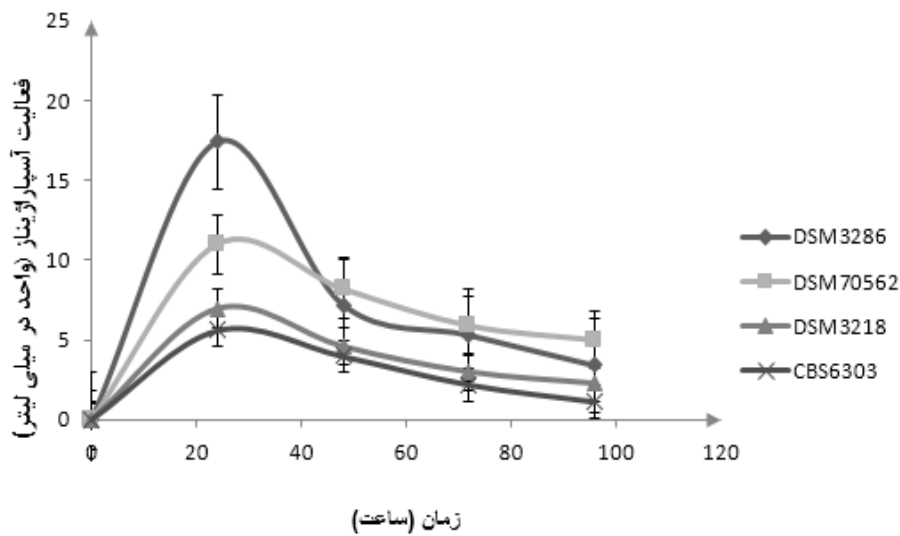
پس از انتقال ۱ درصد مایع تلقیح به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت سیزپکس داکس در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری، نمونه در انکوباتور شیکردار با سرعت چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه‌گیری ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح انجام و میزان رشد سلول‌های مخمیری و مقدار تولید آسپاراژیناز سنجیده شد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود پس از ۲۴ ساعت، سویه‌های DSM3286، DSM70562، DSM3218 و CBS6303 به ترتیب ۱۷/۱۴، ۱۱، ۶/۹۸ و ۵/۶۱ واحد در میلی‌لیتر آسپاراژیناز تولید کردند. سویه DSM 3286 با بیشترین تولید آنزیم آسپاراژیناز سویه برتر تولیدکننده آسپاراژیناز انتخاب شد.

میزان رشد چهار سویه در محیط تولید در زمان تلقیح و ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح اندازه‌گیری شد (شکل ۳) و سویه‌ها رشد تقریباً مشابهی داشتند.

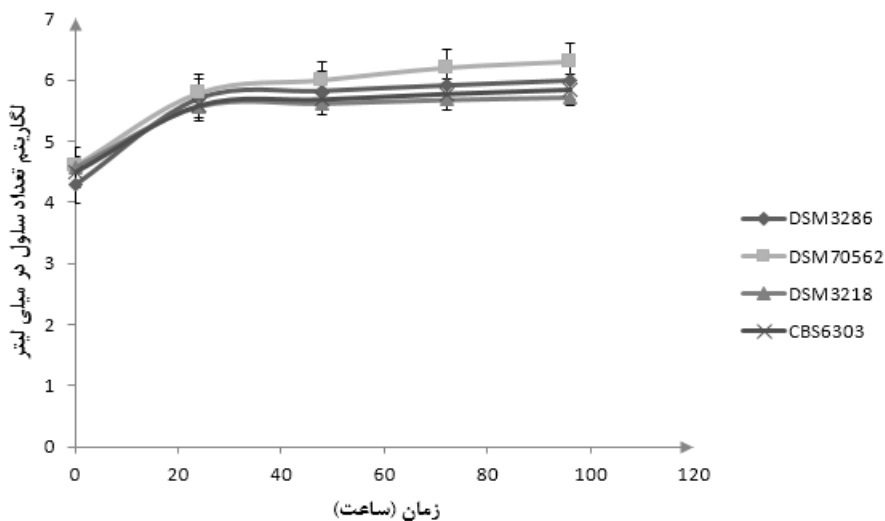
به مدت نیم ساعت در بنماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از پایان یافتن زمان یادشده، ۰/۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (متوقف‌کننده واکنش) به همه لوله‌ها اضافه و با محتویات لوله مخلوط شد. برای هریک از نمونه‌ها، ۳/۷ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول لوله‌های مرحله اول و ۰/۲ میلی‌لیتر معرف نسلر در لوله آزمایش جداگانه‌ای اضافه و مخلوط شد؛ میزان جذب نوری رنگ حاصل از فعالیت آنزیم آسپاراژیناز موجود در نمونه‌ها پس از ۱۵ دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. لوله جداگانه‌ای حاوی محلول‌های مرحله اول و دوم که در آن به جای محلول رویی حاوی آنزیم از آب مقطر استفاده شده بود شاهد در نظر گرفته شد. میزان فعالیت آنزیم آسپاراژیناز بر حسب واحد در میلی‌لیتر طبق این تعریف گزارش شد که یک واحد فعالیت آنزیم مقدار آنزیمی است که در مدت ۱ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته حدود ۸، ۱ میکرومول آمونیاک در محیط آزاد کند (۸).

## نتایج

سویه‌های مخمر *یارروویا لیپولیتیکا* در محیط کشت حداقل آسپاراژین آگار کشت و ۲۴ ساعت در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. با تولید آسپاراژیناز خارج سلولی توسط مخمر، آسپاراژین موجود در محیط به آسپاراتیک اسید و آمونیاک تجزیه و محیط قلیایی می‌شود. محیط کشت یادشده دارای معرف فنلرد (شناساگر اسیدیته) است که در شرایط قلیایی رنگ ارغوانی تا صورتی ایجاد می‌کند؛ در نتیجه همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود همه سویه‌ها هاله صورتی نشان‌دهنده تولید آنزیم آسپاراژیناز را ایجاد می‌کنند.



شکل ۲- تولید آسپاراژیناز توسط سویه‌های DSM 3286، DSM 70562، DSM 3218 و CBS 6303 مخمر یارروویا لیپولیتیکا در محیط تولید سیزپکس داکس



شکل ۳- منحنی رشد سویه‌های DSM 3286، DSM 70562، DSM 3218 و CBS 6303 مخمر یارروویا لیپولیتیکا در محیط تولید سیزپکس داکس

## بحث و نتیجه گیری

ال-آسپاراژیناز آنزیمی است که برای درمان انواع سرطان‌ها و کاهش غلظت آکریل آمید در صنایع غذایی به کار می‌رود. اگرچه این آنزیم در مقایسه با سایر داروهای استفاده شده در شیمی درمانی سازگاری بسیار زیادی با بافت و سازوکارهای حیاتی بدن دارد ممکن است مانند هر داروی دیگری آثار جانبی نامطلوبی

نشان دهد؛ از این رو، پژوهشگران در تلاش برای دستیابی به آسپاراژیناز دارای توان درمانی زیاد و عوارض جانبی کم و تولید ارزان و مقرون به صرفه آن هستند. جستجو برای یافتن آنزیم ال-آسپاراژیناز مناسب دارای اهمیت است و پژوهشگران بسیاری تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از ریز موجودات مختلف را گزارش کرده‌اند (۱۶).

## References

- (1) Dhanam JG., Kannan S. L-asparaginase-Types, perspectives and applications. *Advanced Biotech* 2013; 13(5): 1-5.
- (2) Fullmer A., O'Brien S., Kantarjian H., Jabbour E. Emerging therapy for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Expert Opinion on Emerging Drugs* 2010; 15(1): 1-11.
- (3) Pieters R., Hunger SP., Boos J., Rizzari C., Silverman L., Baruchel A., et al. L-Asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2011; 117(2): 238-249.
- (4) Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson S., Tornqvist M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated food stuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50(17): 4998-5006.
- (5) Xu F., Oruna-Concha MJ., Elmore JS. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. *Food Chemistry* 2016; 210: 163-171.
- (6) Kidd JG. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. *Journal of Experimental Medicine* 1953; 98(6): 565-582.
- (7) Broome JD. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. II. Lymphoma 6C3HED cells cultured in a medium devoid of L-asparagine lose their susceptibility to the effects of guinea pig serum in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 1963; 118: 121-148.
- (8) Imada A., Igarasi S., Nakahama K., Isono M. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. *Journal of General Microbiology* 1973; 76: 85-99.
- (9) Darvishi F., Nahvi I., Zarkesh-Esfahani H., Momenbeik F. Effect of plant oils upon lipase and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009; 2009: 1-7.
- سونیامبی و همکاران طی پژوهشی در سال ۲۰۱۱ فعالیت ضدسرطانی آسپاراژیناز در پنی‌سیلیوم را بررسی کردند. در پژوهش یادشده، ۲۲ گونه از این ریزموجود انتخاب شد و بیشترین میزان تولید آنزیم پس از ۹۶ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با میزان ۵۰ درصد رطوبت برابر ۱۲ واحد در میلی‌لیتر به دست آمد (۱۷).
- در پژوهشی، چهار سویه باکتری *اشریشیا کلی* شامل TOPTEN، K12، LAB و DH5 برای تولید آنزیم آسپاراژیناز بررسی شدند. پس از اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم به روش رنگ‌سنجی آمونیاک، نتایج نشان دادند همه سویه‌ها به‌غیر از TOPTEN آسپاراژیناز تولید می‌کنند و میزان فعالیت آنزیم ۳/۶ واحد در میلی‌لیتر است (۱۸).
- در پژوهش حاضر از مخمر *یارروویا لیپولیتیکا* به‌عنوان سویه‌ای با پتانسیل زیاد برای تولید آسپاراژیناز استفاده شد؛ به این منظور، چند سویه مخمر *یارروویا لیپولیتیکا* استاندارد به‌عنوان ریزموجود تولیدکننده این آنزیم بررسی شدند. با توجه به نتایج مطالعه‌های پیشین، تولید آسپاراژیناز با مقدار ۱۷/۱۴ واحد در میلی‌لیتر توسط سویه DSM 3286 مخمر *یارروویا لیپولیتیکا* پذیرفتنی است. این نخستین گزارش در زمینه تولید آسپاراژیناز توسط مخمر *یارروویا لیپولیتیکا* است. با توجه به اهمیت و کاربرد آسپاراژیناز یوکاریوتی با آثار جانبی کمتر در صنایع دارویی و غذایی، امکان استفاده از نتایج پژوهش حاضر برای گسترش دادن و مقرون‌به‌صرفه کردن تولید آنزیم آسپاراژیناز در داخل کشور وجود دارد.

- (10) Darvishi F., Moradi M., Madzak C., Jolivalt C. Optimization of recombinant laccase production by *Yarrowia lipolytica* in a medium containing glucose as carbon source with Taguchi method. *Biological Journal of Microorganism* 2017; 6(23): 49-56.
- (11) Mafakher L., Mirbagheri M., Darvishi F., Nahvi I., Zarkesh-Esfahani H., Emtiazi, G. Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. *New Biotechnology* 2010; 27(4): 337-40.
- (12) Mirbagheri M., Nahvi I., Emtiazi G., Mafakher L., Darvishi F. Taxonomic characterization and potential biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica* isolated from meat and meat products. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2012; 5(1): 346-351.
- (13) Darvishi F., Hosseini B. Effect of olive oil with different purity grades on *Yarrowia lipolytica* lipase production. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 4(13): 35-42.
- (14) Gulati R., Sexena RK., Gupta R. A rapid plate assay screening L-asparaginase producing micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* 1996; 24: 23-26.
- (15) Darvishi F. Expression of native and mutant extracellular lipases from *Yarrowia lipolytica* in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microbial Biotechnology* 2012; 5(5): 634-641.
- (16) Batoool T., Makky EA., Jalal M., Yusoff MM. A comprehensive review on L-asparaginase and its applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2016; 178(5): 900-923.
- (17) Soniymby AR., Lalitha S., Praveesh BV., Priyadarshini V. Isolation, production and anti-tumor activity of L-asparaginase of *Penicillium* sp. *Microbiological Research* 2011; 2(1): 38-42
- (18) Ghane M., Bambaiei B., Ghane M. Screening of *Escherichia coli* strains for asparaginase (II) production. *Biological Sciences* 2009; 4: 49-56.