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

Archive of SID

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 Czapex 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 Czapex 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

www.SID.ir

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 *یاررووپا لیپولیتیکا*

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

چکیده

مقدمه: آنزیم ال- آسپاراژیناز تجزیهٔ ال- آسپاراژین را به ال- آسپاراتیک‌اسید 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 آکریل‌آمید کاربرد دارد. باتوجه‌به کاربردهای مهم این آنزیم، هدف پژوهش حاضر معرفی منبع جدید میکروبی برای تولید ال- آسپاراژیناز یوکاریوتی است.

مواد و روش‌ها: تولید کمّی و کیفی ال-آسپاراژیناز در چهار سویهٔ مخمر *یاررووپا لیپولیتیکا* بررسی شد. بررسی کیفی تولید ال-آسپاراژیناز روی محیط‌کشت حداقل آسپاراژین‌آگار و سنجش کمّی ال- آسپاراژیناز در محیط‌کشت سیزپکس داکس به روش طیف نورسنجی با معرف نسلر انجام شد.

نتایج: هر چهار سویه با ایجاد هالهٔ ارغوانی‌رنگ اطراف کلنی نشان دادند قادر به تولید آنزیم آسپاراژیناز هستند. پس‌از ۲۴ ساعت، سویه‌های DSM3286، DSM70562، DSM3218 و CBS6303 به‌ترتیب ۱۷/۱۴، ۱۱، ۶/۹۸ و ۵/۶۱ واحددرمیلی‌لیتر آسپاراژیناز در محیط‌کشت سیزپکس داکس تولید کردند.

بحث و نتیجه‌گیری: *یاررووپا لیپولیتیکا* سویهٔ DSM 3286 با ایجاد بیشترین قطر هاله و تولید بیشترین مقدار آنزیم آسپاراژیناز بهترین سویهٔ تولیدکنندهٔ آسپاراژیناز انتخاب شد. امکان استفاده از مخمر یاررووپا لیپولیتیکا به‌شکل منبع بالقوه‌ای از ال- آسپاراژیناز وجود دارد.

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

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

آنزیم ال- آسپاراژیناز (EC.3.5.1.1; asparagine amidohydrolase) تجزیهٔ 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 به‌واسطهٔ 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 ازنظر فناوری و زیست‌پزشکی است که در درمان انواع لوسمی‌ها مانند لوسمی لنفوبلاستیک حاد، لنفوسارکوما، لنفومای هوچکین، لنفومای غیرهوچکین 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 درجهٔ 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 خوکچهٔ هندی دارای ویژگی ضدتوموری است (۶) و سپس دریافتند ویژگی ضدتوموری سرم خوکچهٔ هندی ناشی از آنزیم آسپاراژیناز است (۷). در پژوهش‌های بعدی مشخص شد آنزیم آسپاراژیناز خالص‌شده از باکتری *اشریشیا کلی* مشابه سرم خوکچهٔ هندی دارای فعالیت ضدتوموری است. ایمادا و همکاران در سال ۱۹۷۳ ریزموجودات بسیاری را ازنظر 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 *یاروویا لیپولیتیکا* را شناسایی کرد. بیشترین دمای رشد این مخمر ۳۲ تا ۳۴ درجهٔ سانتی‌گراد است؛ ازاین‌رو 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 *یاروویا لیپولیتیکا* منابع مختلف کربن ازجمله هیدروکربن‌ها، اسیدهای چرب، الکل‌ها و استات را مصرف می‌کند و به‌علت چربی‌دوست‌بودن به‌آسانی از منابع مختلف لیپیدی و هیدروکربنی جدا می‌شود. این مخمر به‌علت قابلیت تولید آنزیم‌ها و متابولیت‌های مختلف ازجمله سیتریک‌اسید، لیپازها و استرازها موردتوجه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته است (۱۱ و ۱۲).

Archive of SID

www.SID.ir

باتوجه‌به 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 *یاررورویا لیپولیتیکا* می‌توان برای دستیابی به آسپاراژیناز جدید با منشأ یوکاریوتی و دارای آثار نامطلوب کمتر و همچنین مقرون‌به‌صرفه‌کردن تولید آنزیم برای درمان بیماران مبتلا به سرطان استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های میکروبی: در پژوهش حاضر از چهار سویهٔ استاندارد مخمر *یاررورویا لیپولیتیکا* DSM 3286، CBS 6303، DSM 70562 و DSM 3218 استفاده شد که از مجموعهٔ DSMZ آلمان تهیه شده بودند. از محیط‌کشت YPD حاوی ۲۰ گرم‌درلیتر گلوکز، ۲۰ گرم‌درلیتر پپتون، ۱۰ گرم‌درلیتر عصارهٔ مخمر و ۱۷ گرم‌درلیتر آگار برای کشت این مخمر در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد به‌شکل جامد و مایع استفاده شد و نمونه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۳).

محیط سنجش کیفی تولید آسپاراژیناز: برای شناسایی مخمرهای تولیدکنندهٔ آسپاراژیناز بر اساس روش سنجش سریع از محیط حداقل آسپاراژین‌آگار حاوی ۱ درصد آسپاراژین، ۰/۰۵ درصد سولفات‌منیزیم، ۰/۰۵ درصد کلرایدپتاسیم، ۰/۰۲ درصد کلرایدسدیم، ۰/۰۱۲ درصد فنل‌رد (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 هالهٔ ارغوانی‌رنگ اطراف کلنی ایجاد می‌کنند. قطر هاله‌های ایجادشده پس‌از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۹ درجهٔ سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد (۱۴).

آماده‌سازی مایع تلقیح: فعال‌سازی سویه‌ها با کشت روی محیط YPD انجام شد. پس‌از گرماگذاری به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۹ درجهٔ سانتی‌گراد، یک کلنی (مایع تلقیح) به ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط YPDمایع بدون آگار انتقال داده شد. سپس ارلن‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۹ درجهٔ سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۲۰۰ دوردردقیقه 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 محیط‌کشت تولید حاوی ۲ گرم‌درلیتر گلوکز، ۱۰ گرم‌درلیتر آسپاراژین، ۱/۲۵ گرم‌درلیتر فسفات‌هیدروژن‌دی‌پتاسیم، ۰/۵۲ گرم‌درلیتر کلرایدپتاسیم، ۰/۰۳ گرم‌درلیتر سولفات‌آهن، ۰/۰۵ گرم‌درلیتر سولفات‌روی در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری تهیه شد. سپس در شرایط استریل، ۱ درصد مایع تلقیح به محیط تولید منتقل شد و میزان رشد مخمرها پس‌از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۹ درجهٔ سانتی‌گراد بررسی شد. میزان تولید آسپاراژیناز به روش رنگ‌سنجی بر پایهٔ 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 مرحلهٔ نخست، از محیط‌های کشت مخمر نمونه‌برداری شد و نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شدند. ۰/۵ میلی‌لیتر محلول رویی به لوله‌های آزمایش حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر بافر تریس با اسیدیتهٔ حدود ۸/۲، ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر ال- آسپاراژین اضافه و مخلوط شد و نمونه‌ها

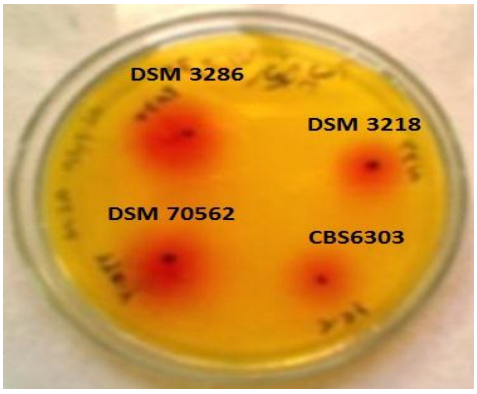
Archive of SID

www.SID.ir

به‌مدت نیم ساعت در بنماری ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. پس‌از پایان‌یافتن زمان یادشده، ۰/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید (متوقف‌کنندهٔ واکنش) به همهٔ لوله‌ها اضافه و با محتویات لوله مخلوط شد. برای هریک از نمونه‌ها، ۳/۷ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول لوله‌های مرحلهٔ اول و ۰/۲ میلی‌لیتر معرف نسلر در لولهٔ آزمایش جداگانه‌ای اضافه و مخلوط شد؛ میزان جذب نوری رنگ حاصل از فعالیت آنزیم آسپاراژیناز موجود در نمونه‌ها پس‌از ۱۵ دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. لولهٔ جداگانه‌ای حاوی محلول‌های مرحلهٔ اول و دوم که در آن به‌جای محلول رویی حاوی آنزیم از آب مقطر استفاده شده بود شاهد در نظر گرفته شد. میزان فعالیت آنزیم آسپاراژیناز بر حسب واحددرمیلی‌لیتر طبق این تعریف گزارش شد که یک واحد فعالیت آنزیم مقدار آنزیمی است که در مدت ۱ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و اسیدیتهٔ حدود ۸، ۱ میکرومول آمونیاک در محیط آزاد کند (۸).

نتایج

سویه‌های مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* در محیط‌کشت حداقل آسپاراژین‌آگار کشت و ۲۴ ساعت در دمای ۲۹ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. با تولید آسپاراژیناز خارج‌سلولی توسط مخمر، آسپاراژین موجود در محیط به آسپاراتیک‌اسید و آمونیاک تجزیه و محیط قلیایی می‌شود. محیط‌کشت 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 همهٔ سویه‌ها هالهٔ صورتی نشان‌دهندهٔ تولید آنزیم آسپاراژیناز را ایجاد می‌کنند. نسبت قطر هالهٔ تولید آنزیم به قطر کلنی سویهٔ DSM 3286 بیشترین میزان را داشت.



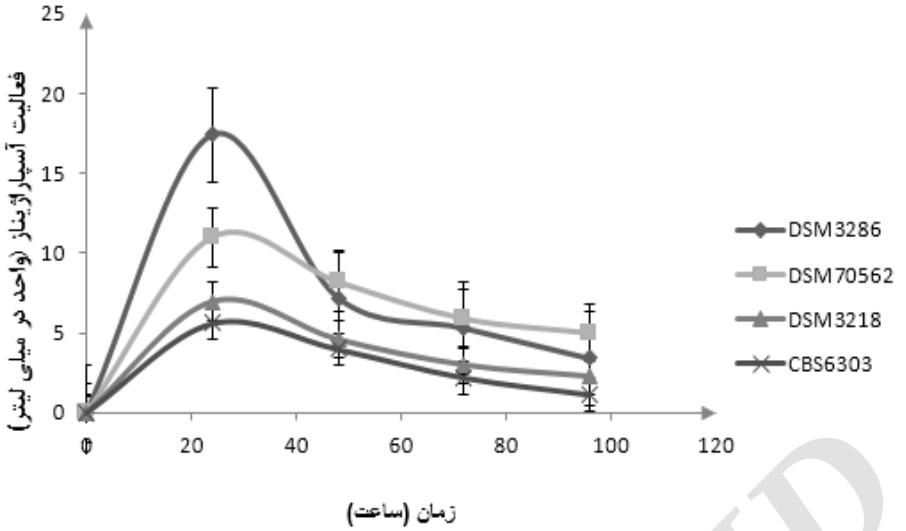
شکل ۱- تغییر رنگ محیط‌کشت حداقل آسپاراژین‌آگار حاوی معرف فنل‌رد در اثر تولید آنزیم خارج‌سلولی آسپاراژیناز توسط سویه‌های مختلف مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* پس‌از ۲۴ ساعت. نسبت قطر هالهٔ تولید آنزیم به قطر کلنی سویه‌ها به‌ترتیب میزان نسبت عبارتست از: DSM 3286، DSM 70562، DSM 3218 و CBS 6303.

پس‌از انتقال ۱ درصد مایع تلقیح به ۵۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت سیزپکس داکس در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری، نمونه در انکوباتور شیکردار با سرعت چرخش ۲۰۰ دوردردقیقه و دمای ۲۹ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه‌گیری ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس‌از تلقیح انجام و میزان رشد سلول‌های مخمری و مقدار تولید آسپاراژیناز سنجیده شد. همان‌طورکه در شکل ۲ مشاهده می‌شود پس‌از ۲۴ ساعت، سویه‌های DSM3286، DSM70562، DSM3218 و CBS6303 به‌ترتیب ۱۷/۱۴، ۱۱، ۶/۹۸ و ۵/۶۱ واحددرمیلی‌لیتر آسپاراژیناز تولید کردند. سویهٔ DSM 3286 با بیشترین تولید آنزیم آسپاراژیناز سویهٔ برتر تولیدکنندهٔ آسپاراژیناز انتخاب شد.

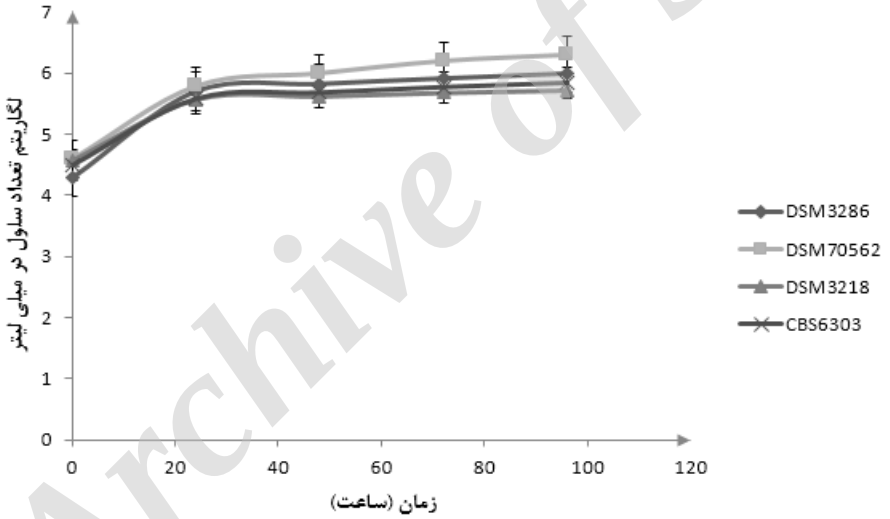
میزان رشد چهار سویه در محیط تولید در زمان تلقیح و ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح اندازه‌گیری شد (شکل ۳) و سویه‌ها رشد تقریباً مشابهی داشتند.

Archive of SID

www.SID.ir



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



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

بحث و نتیجه‌گیری

ال- آسپاراژیناز آنزیمی است که برای درمان انواع سرطان‌ها و کاهش غلظت آکریل‌آمید در صنایع غذایی به کار می‌رود. اگرچه این آنزیم در مقایسه با سایر داروهای استفاده‌شده در شیمی‌درمانی سازگاری بسیار زیادی با بافت و سازوکارهای حیاتی بدن دارد ممکن است مانند هر داروی دیگری آثار جانبی نامطلوبی نشان دهد؛ ازاین‌رو، پژوهشگران در تلاش برای دستیابی به آسپاراژیناز دارای توان درمانی زیاد و عوارض جانبی کم و تولید ارزان و مقرون‌به‌صرفهٔ آن هستند. جستجو برای یافتن آنزیم ال- آسپاراژیناز مناسب دارای اهمیت است و پژوهشگران بسیاری تولید آنزیم ال- آسپاراژیناز از ریزموجودات مختلف راگزارش کرده‌اند (۱۶).

Archive of SID

www.SID.ir

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 پس‌از ۹۶ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد با میزان ۵۰ درصد رطوبت برابر ۱۲ واحد در میلی لیتر به دست آمد (۱۷).

در پژوهشی، چهار سویه باکتری *اشریشیا کلی* شامل TOPTEN، K12، LAB و DH5 برای تولید آنزیم آسپاراژیناز بررسی شدند. پس‌از اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم به روش رنگ‌سنجی آمونیاک، نتایج نشان دادند همهٔ سویه‌ها به‌غیراز TOPTEN آسپاراژیناز تولید می‌کنند و میزان فعالیت آنزیم ۳/۶ واحددرمیلی‌لیتر است (۱۸).

در پژوهش حاضر از مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* به‌عنوان سویه‌ای با پتانسیل زیاد برای تولید آسپاراژیناز استفاده شد؛ به این منظور، چند سویه مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* استاندارد به‌عنوان ریزموجود تولیدکنندهٔ این آنزیم بررسی شدند. باتوجه‌به نتایج مطالعه‌های پیشین، تولید آسپاراژیناز با مقدار ۱۷/۱۴ واحددرمیلی‌لیتر توسط سویهٔ DSM 3286 مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* پذیرفتنی است. این نخستین گزارش در زمینهٔ تولید آسپاراژیناز توسط مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* است. باتوجه‌به اهمیت و کاربرد آسپاراژیناز یوکاریوتی با آثار جانبی کمتر در صنایع دارویی و غذایی، امکان استفاده از نتایج پژوهش حاضر برای گسترش‌دادن و مقرون‌به‌صرفه‌کردن تولید آنزیم آسپاراژیناز در داخل کشور وجود دارد.

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) 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.

Archive of SID

www.SID.ir

(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 Microbilogy* 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) Batool 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 *Pencillium* sp. *Microbiological Research* 2011; 2(1): 38-42

(18) Ghane M., Bambaei B., Ghane M. Screening of Escherichia coli strains for asparaginase (II) production. *Biological Sciences* 2009; 4: 49-56.

Archive of SID

www.SID.ir