بررسی برخی از ویژگی های بیوشیمیایی آنزیم کاتالاز در گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* (*L.cv. I L-111*

حسین طایفی نصرآبادی[1*]، غلامرضا دهقان[2]، بهرخ دایی حسنی[3]، علی موافقی[2]، عباس صمدی[4]

[1]عضو هیأت علمی گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز
[2]عضو هیأت علمی گروه زیست شناسی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
[3]دانشجوی دوره دکتری تخصصی زیست شناسی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
[4]عضو هیأت علمی گروه علوم خاک شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

چکیده

گلرنگ با نام علمی *Carthamus tinctorius L.* شامل گونه هایی است کـه از ارزش دارویـی و غذایی بالایی برخوردار می باشد. به علت مقاومت بالای گلرنگ به شرایط تنش زای محیطی، دانـشمندان از این گیاه به عنوان یک مدل جهت بررسی و درک مکانیسمهای دفـاعی بـر علیـه تـنش هـای محیطـی استفاده می‌نمایند. با توجه به اهمیت سیستم آنزیمی آنتی اکـسیدانی بـه عنـوان یکـی از عوامـل مـوثر در افزایش ضریب مقاومت گیاهان به تنشهای محیطی، در این تحقیق برخـی از خـواص بیوشـیمیایی آنـزیم کاتالاز در گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius L.cv. I L-111*) و حساسیت آن به دو مهار کننده آزاید و سیانید بررسی گردید. گیاه گلرنگ به صورت هیدروپونیک در بستر کشت پرلیت بـرای مـدت 40 روز رشد داده شد. کاتالاز (6، 1، 11، 1 EC) از برگ های این گیـاه بـا اسـتفاده از بـافر فـسفات 0/1M، 7/2 =pH استخراج گردید. بررسی اثر pH های مختلف، غلظت های مختلف سوبسترا، مهارکننده های آزایـد و سیانید و بررسی اثر دما بر فعالیت کاتالازی گلرنگ و همچنین بررسی ژل الکتروفورز غیردناتورانـت از عصاره گلرنگ، وجود حداقل دو ایزوآنزیم کاتالاز به ترتیب با pH های اپتیمم 6/5 و 8/5 در این گیـاه را تایید نمود. ایزوآنزیم فعال در pH= 8/5 در مقایسه با ایزوآنزیم فعال در pH= 6/5 نسبت به دما مقاوم تر می باشد. بررسی اثر مهارکننده ها بر ایزوآنزیم های کاتـالاز نـشان داد کـه ایزوآنـزیم بـا pH اپتـیمم 8/5 نسبت به ایزوآنزیم با pH اپتیمم 6/5 هم به یون سیانید و هم به یون آزایـد بـه ترتیـب 4/6 برابـر و 2/6 برابر حساستر می‌باشد.

کلمات کلیدی: ***کاتالاز، گلرنگ، سینتیک، مهار کننده، پایداری دمایی***

[*] نویسنده مسئول: حسین طایفی نصرآبادی تلفن: 04113392378 Email: tayefi@tabrizu.ac.ir

مقدمه

گلرنگ[1] با نام علمی ***Carthamus tinctorius L.*** متعلق به تیره مرکبان[2] می باشد. منشا اولیه این گیاه عربستان بوده و کشت آن در ایران و کشورهایی همچون هند، پاکستان و افغانستان از قدمت بالایی برخوردار می‌باشد. از دانه های گلرنگ روغن خوراکی و از گلهای آن جهت طعم دار نمودن غذاها و تولید رنگ استفاده می‌شود. ایران با داشتن گونه های فراوان زراعی و وحشی این گیاه یکی از مهمترین ذخایر ژنتیکی گلرنگ محسوب می‌گردد (Zohary and Hopf, 2000). به طور کلی، گیاهان از طریق سازوکارهای خاص فیزیولوژی و بیوشیمیایی با تنش‌های مختلف محیطی مقابله می‌نمایند. مکانیسم مقاومت در برخی از تنش‌ها به صورت یک ارتباط درونی و نتیجه یک برنامه‌ریزی هماهنگ و پیچیده است. در شرایط تنش، عدم توازن بین فرآیند جذب انرژی و مصرف آن توسط اندام فتوسنتزی باعث تولید انواع گونه‌های اکسیژن فعال و ناتوانی گیاه در مهار آن می‌گردد که در نهایت منجر به بروز صدمات اکسیداتیو می‌شود (Chaudiere and Ferrari-Lliou, 1999). مکانیسم های مختلفی جهت مقابله با گونه‌های فعال اکسیژن در موجودات زنده یافت شده که می‌توان به یکی از مهمترین آنها به نام سیستم‌های آنزیمی آنتی اکسیدانی اشاره کرد. این سیستم، شامل آنزیم هایی از قبیل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز می‌باشد. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از طریق تبدیل O_2 به H_2O_2 از سمیت آنیون سوپراکسید کاسته و سپس پراکسید هیدروژن تجمع یافته در محیط، توسط گروهی از آنزیم ها بنام هیدروپراکسیدازها، سم زدایی می‌شود. هیدروپراکسیدازها از سه زیر گروه مختلف آنزیمی به نام کاتالازها، کاتالاز-پراکسیدازهای دو عملکردی[3] و پراکسیدازها تشکیل شده اند (Chaudiere and Ferrari-Lliou, 1999). کاتالاز (H_2O_2:H_2O_2 اکسیدوردکتاز 6. 1. 11. 1 EC) آنزیمی است که در تمام موجودات زنده از جمله سلول‌های گیاهی، جانوری و میکرواگانیسم های هوازی یافت شده و به عنوان یکی از مهمترین آنزیم های آنتی اکسیدانی با تجزیه H_2O_2 به آب و اکسیژن نقش در کاهش پراکسید هیدروژن را ایفا می نماید (Bloch *et al.*, 2007; Preston *et al.*, 2001; Scandalios *et al.*, 1997). در گیاهان، آنزیم کاتالاز در اندامکی به نام پراکسیزوم قرار دارد و نقش مهمی را در جاروبگری H_2O_2 تولید شده به وسیله فرآیندهایی همچون β-اکسیداسیون اسیدهای چرب، اکسیداسیون در حین تنفس نوری و انتقال الکترون در زنجیره تنفسی میتوکندری‌ها را ایفا می‌نماید (Scandalios *et al.* 1997). علاوه بر این، نقش کاتالاز در سیستم دفاعی و پدیده پیری در گیاهان نیز به اثبات رسیده است (Mura *et al.*

[1] Safflower
[2] Compositae
[3] Bi-functional catalase-peroxidase

(2007. خواص بیوشیمیایی آنزیم کاتالاز در بسیاری از گیاهان از جمله زعفران، خردل، اسفناج، پنبه، جعفری، گندم، آفتابگردان، ذرت، دانه کرچک، تنباکو و کلم قمری بررسی گردیده است و مشخص شده است که این آنزیم در اغلب گیاهان ذکر شده دارای ایزوآنزیم های مختلفی است (Tayefi-Nasrabadi, 2008; Mullen and Gifford, 1993; Garcia *et al*., 2000; Keyhani *et al*., 2002). علی رغم توصیف گیاه گلرنگ در کتاب‌ها و منابع علمی گیاهشناسی جهان، اطلاعات پایه‌ای خاصی در مورد فیزیولوژی و بیوشیمی این گیاه وجود ندارد. هدف از این تحقیق، بررسی بعضی از خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم کاتالاز از جمله تعداد ایزوآنزیم‌ها، اثر مهارکننده‌های آزاید و سیانید، مقادیر پارامترهای سینتیکی (Km و Vmax)، بازده کاتالیتیکی، و پایداری حرارتی آن در عصاره خام گلرنگ می‌باشد.

مواد و روشها

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده جهت الکتروفورز، از شرکت سیگما (Sigma Chem. Co.) خریداری گردید. بقیه مواد مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک[1] تهیه گردید.

آماده سازی نمونه های گیاهی

بذر رقم مورد نظر گلرنگ از موسسه اصلاح نهال و بذر کرج تهیه شده و در قالب تکرارهای معین در شرایط هیدروپونیک در بستر پرلیت کشت داده شدند. رشد گیاهان با استفاده از محلول غذایی هوگلند به مدت 40 روز ادامه یافت. جهت آماده سازی عصاره، 1 گرم برگ گلرنگ در حضور 3ml بافر فسفات (0/1 مولار، pH7/2) حاوی 1 میلی مولار EDTA، 2 درصد پلی وینیل پیرولیدون و نیز 0/02 درصد P.M.S.F (جهت افزایش پایداری کاتالاز) با دستگاه هموژنایزر هموژن گردید. سپس مخلوط هموژن سریعا در دور 20000 g به مدت 20 دقیقه در دمای 4 درجه سانتیگراد، سانتریفوژ گردید. محلول رویی به دست آمده جهت سنجش های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. جهت اندازه گیری پروتئین تام از روش لوری (Lowry *et al*., 1951) استفاده گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز از طریق اندازه گیری میزان کاهش جذب ناشی از تجزیه سوبسترای پراکسید هیدروژن در طول موج 240 نانومتر با احتساب ضریب جذب مولی[2] $M^{-1}.Cm^{-1}$ 27 به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد(Obinger *et al*., 1997). محلول آزمایش با حجم نهایی 3 میلی لیتر، حاوی 100 میکرولیتر عصاره، بافر سیترات-فسفات- بورات (0/1 مولار با pH های مربوطه)، 50 میکرولیتر H_2O_2 با غلظت نهایی 0/5 تا 38 میلی مولار (برای

[1] Merck

[2] - Extinction coefficient

محاسبه Vmaxو Km) یا 10 میلی مولار (برای سایر سنجش‌ها) مورد استفاده قرار گرفت. یک واحد (Unit) فعالیت آنزیم کاتالاز به عنوان مقدار آنزیم مورد نیاز برای تجزیه 1 µmol سوبسترای پراکسید هیدروژن در یک دقیقه در نظر گرفته شد. تمام سنجش ها با سه بار تکرار انجام پذیرفت و میانگین نتایج به دست آمده گزارش گردید.

سنجش پایداری دمایی

جهت اندازه گیری پایداری دمایی آنزیم کاتالاز، مقادیر مناسبی از عصاره (در لوله های اپندرف 1/5 میلی لیتر) در دمای بین 70-25 °C در دستگاه بن ماری ترمواستاتیک، انکوبه گردید، سپس در زمان‌های تعیین شده (60-5 دقیقه) عصاره از بن ماری خارج و به مدت 5 دقیقه در داخل یخ قرار داده شد. آنگاه فعالیت کاتالازی عصاره بر طبق روش گفته شده در بالا در دمای آزمایشگاه اندازه گیری شد. فعالیت کاتالازی عصاره در دمای 25 °C به عنوان فعالیت 100% در نظر گرفته شد (Tayefi-Nasrabadi, 2008).

بررسی فعالیت کاتالازی در حضور مهارکننده‌های آزاید و سیانید

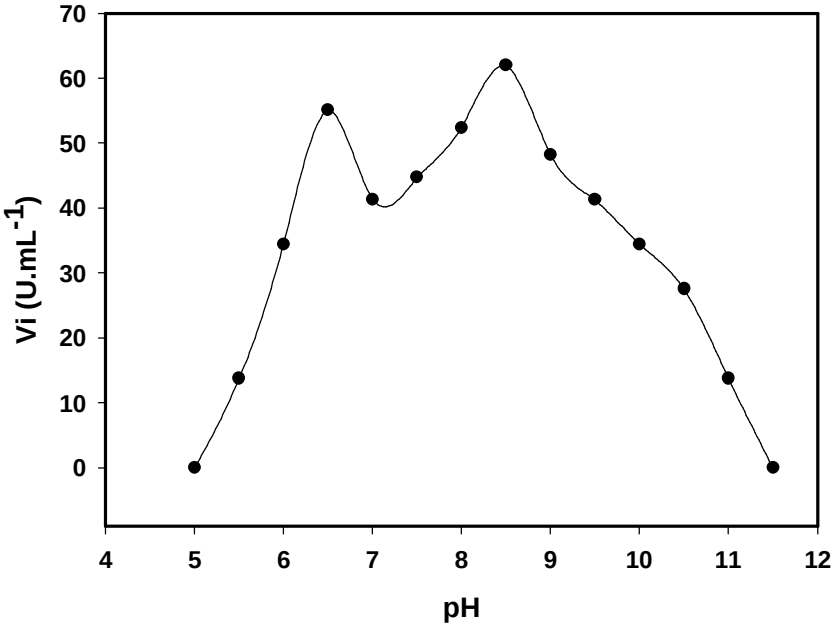
جهت بررسی اثر هر یک از مهارکننده‌های آزاید و سیانید بر فعالیت کاتالازی عصاره گلرنگ، مقادیر مختلفی از هر یک از مهارکننده ها به‌طور جداگانه به محلول واکنش که حاوی عصاره بود اضافه و سپس جهت شروع واکنش به آن پراکسید هیدروژن اضافه گردید.

بررسی فعالیت کاتالازی عصاره از طریق الکتروفورز

جهت بررسی حداقل تعداد ایزوآنزیم‌های کاتالاز موجود در عصاره گلرنگ از الکتروفورز طبیعی (غیر دناتورانت) با ژل پلی اکریل آمید و رنگ آمیزی بر اساس فعالیت آنزیمی طبق روش Woodbury استفاده گردید (Woodbury *et al.*, 1971). ژل ابتدا به مدت 10 دقیقه در محلول 0/003 درصد پراکسید هیدروژن انکوبه شد آنگاه پس از شستشو با آب دوبار تقطیر به وسیله محلول $FeCl_3$ (یک درصد) و $K_3Fe(CN_6)$ (یک درصد) به مدت 10 دقیقه رنگ آمیزی گردید.

نتایج و بحث

بررسی اثر pH های مختلف (تهیه پروفایل pH)، غلظت‌های مختلف سوبسترا (Vmax و Km)، مهارکننده های آزاید و سیانید و نیز بررسی اثر دما (بررسی پایداری دمایی) بر فعالیت آنزیم کاتالاز گلرنگ اساس مطالعه این پژوهش در راستای شناسایی انواع مختلف ایزوآنزیم‌های کاتالاز در این گونه بوده است.



شکل 1- تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز گلرنگ (cv. IL-111) در pH های مختلف.

Figure 1- pH dependency of catalase activity in leaves extract of safflower (cv. IL-111).

شکل1، پروفایل pH یا به عبارت دیگر تغییرات فعالیت کاتالازی عصاره گیاه گلرنگ در حضور سوبسترای پراکسید هیدروژن (غلظت 10 mM) در pH های مختلف را نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده از این شکل نشان می‌دهد که اولا فعالیت کاتالازی در این گیاه در محدوده[1] وسیعی از pH (از pH معادل 5 تا 11/5) مشاهده می‌شود. ثانیا پروفایل pH به دست آمده دارای دو پیک شاخص و مجزا به ترتیب در pH های 6/5 و 8/5 می‌باشد. بر طبق نظریه فالبروک (Fullbrook, 1996) وجود چندین pH بهینه مختلف برای یک نوع فعالیت آنزیمی در یک محلول، بیانگر وجود ایزوآنزیم‌های جداگانه برای آن آنزیم خاص در محلول می‌باشد (Schulz, 1994). بر طبق این نظریه می‌توان پیش بینی نمود که احتمالاً گلرنگ حاوی حداقل دو ایزوآنزیم کاتالاز می‌باشد که به ترتیب دارای pH های بهینه در 6/5 و 8/5 می‌باشند. جهت بررسی‌های بیشتر، مقادیر Km، Vmax، بازده کاتالیتیکی (Vmax/Km) آنزیم کاتالاز عصاره گلرنگ و حساسیت آن به مهارکننده‌های آزاید و سیانید در هر دو pH اپتیمم نیز اندازه‌گیری شد (جدول 1 و شکل 2). با بررسی نتایج موجود در جدول 1 مشاهده می‌شود که مقادیر پارامترهای Km و Vmax به دست آمده از فعالیت کاتالازی در عصاره گیاه گلرنگ در دو pH اپتیمم 6/5 و 8/5 کاملاً باهم

[1] Range

متفاوت است، به طوریکه Km کاتالاز فعال در pH= 8/5 دقیقاً 2 برابر Km کاتالاز فعال در pH=6/5 می‌باشد. همچنین مقادیر Vmax کاتالاز فعال در pH= 8/5 تقریباً 2 برابر Vmax کاتالاز فعال در pH= 6/5 به دست آمده است. شکل 2 اثر مهارکننده‌های آزاید و سیانید بر فعالیت کاتالازی گیاه گلرنگ را در دو pH اپتیمم نشان می‌دهد. با آنالیز شکل فوق و محاسبه مقادیر IC_{50} برای هر یک از مهارکننده‌ها مشاهده می‌شود که ایزوآنزیم با pH اپتیمم 8/5 نسبت به ایزوآنزیم با pH اپتیمم 6/5 هم به یون سیانید و هم به یون آزاید بترتیب 4/6 برابر و 2/6 برابر حساستر می‌باشد.

جدول 1- پارامترهای سینتیکی آنزیم کاتالاز و حساسیت آن به مهارکننده‌های آزاید و سیانید در گیاه گلرنگ در دو pH اپتیمم.

pH optima	Km (mM)	Vmax (U/ml)	Vmax/Km	IC_{50} for azide (µM)	IC_{50} for cyanide (µM)
6.5	3.5	56.49	16.14	250	125
8.5	7	110.22	15.74	95	27

Table 1- Kinetic parameters and sensitivity to azide and cyanide of the catalase activity in safflower (cv. IL-111) leaves extract at two pH optima.

پایداری دمایی ایزوآنزیم‌های کاتالاز در گیاه گلرنگ در شکل 3 نشان داده شده است. با مشاهده شکل فوق می‌توان نتیجه‌گیری نمود که ایزوآنزیم فعال در pH = 6/5 نسبت به ایزوآنزیم فعال در pH= 8/5 نسبت به دما حساس تر بوده به طوریکه پس از 60 دقیقه انکوباسیون[1] در دمای 70 درجه سانتیگراد میزان فعالیت آن 20 درصد شاهد بوده درحالی که ایزوآنزیم دیگر تحت همین شرایط فعالیتی در حدود 40 درصد شاهد را از خود نشان می‌دهد. مجموعه نتایج به دست آمده در بالا نشان می‌دهد که دو ایزوآنزیم کاتالاز فعال در گیاه گلرنگ دارای خصوصیات سینتیکی کاملاً مجزایی می‌باشند. خواص سینتیکی کاملاً مجزا برای هر یک از آنزیم‌های کاتالاز در عصاره گلرنگ، حاکی از وجود نقش‌های متابولیکی مجزایی برای هر یک از این ایزوآنزیم‌ها در گیاه می‌باشد. جهت تایید نهایی وجود حداقل تعداد ایزوآنزیم‌های کاتالاز موجود در گیاه گلرنگ، از ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید طبیعی (غیردناتورانت[2]) و رنگ آمیزی بر اساس فعالیت کاتالازی استفاده گردید (شکل 4). همان طور که در شکل 4 مشاهده می شود پس از رنگ آمیزی اختصاصی ژل وجود دو باند مجزا در ژل

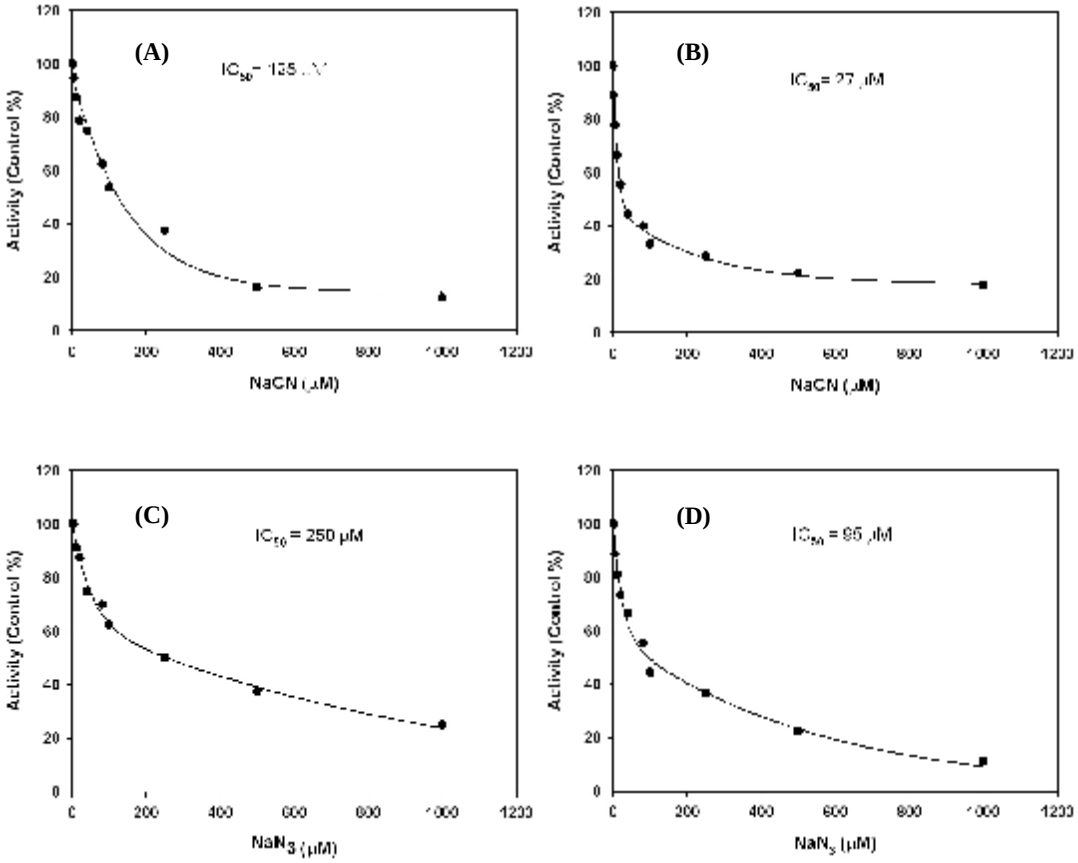
[1] - Incuation

[2]- Non-denaturant

به خوبی مشهود می‌باشد. وجود دو باند مجزا بیانگر وجود حداقل دو ایزوآنزیم کاتالاز در گیاه گلرنگ بوده که این نتیجه تاییدکننده نتایج قبلی حاصل از آنالیز داده های سینتیکی آنزیم کاتالاز در گیاه گلرنگ می‌باشد.

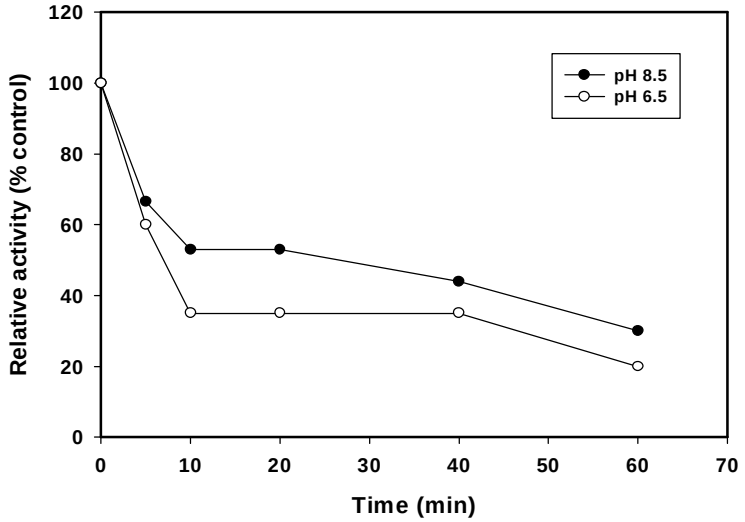
سپاسگزاری

از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز تشکر و قدردانی می گردد.



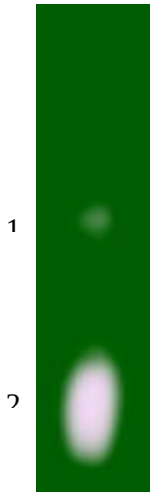
شکل 2- مهار فعالیت آنزیم کاتالاز گلرنگ (cv. IL-111) در حضور یون سیانید درpH 6/5 (A) و pH 8/5 (B) و مهار فعالیت آنزیم کاتالاز گلرنگ (cv. IL-111) در حضور یون آزاید درpH 6/5 (C) و pH 8/5 (D).

Figure 2- Inhibition by cyanide against IL-111 catalase at pHs 6.5 (A) and 8.5 (B). Inhibition by azide against IL-111 catalase at pHs 6.5 (C) and 8.5 (D).



شکل 3- پایداری دمایی ایزوآنزیم های کاتالاز گلرنگ (cv. IL-111) در pH های 6/5 و 8/5 در دمای 70 درجه سانتیگراد.

Figure 3- Thermal stability of IL-111 catalase at pHs 6.5 (O) and 8.5 (•). Extract was incubated for various time intervals (1 - 60 min) at 70 °C.



شکل 4- ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید غیردناتورانت (طبیعی) عصاره گیاه گلرنگ که بر اساس فعالیت کاتالازی رنگ آمیزی گردیده است. باندهای 1 و 2 بیانگر وجود حداقل دو ایزوآنزیم کاتالاز در عصاره گیاه گلرنگ می‌باشد.

Figure 4- Non-denaturing PAGE of extract stained for catalase activity. Bands 1 and 2 presented different catalase isoforms.

منابع

Bloch KE, Shichman M, Vorobeychik D, Vardi P (2007). Catalase expression in pancreatic alpha cells of diabetic and non-diabetic mice. Histochemistry and Cell Biology 127: 227-232.

Chaudiere J, Ferrari-Lliou R (1999). Intracellular antioxidants: From chemical to biochemical mechanisms. Food and Chemical Toxicology 37: 949-962.

Fullbrook Pd (1996). In Industrial Enzymology (Godfrey T, West S, eds), 2nd edition Macmillan Press, London. 508-509.

Garcia R, Kaid N, Vignaud C, Nicolas J (2000). Purification and some properties of catalase from Wheat germ (*Triticum aestivum L.*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 1050-1057.

Keyhani J, Keyhani E, Kamali J (2002). Thermal stability of catalases active in dormant saffron (*Crocus sativus L.*) corms. Molecular Biology Reports 29: 125-128.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.

Mullen RT, Gifford DJ (1993). Purification and characterization of catalase from Loblolly Pine (*Pinus taeda L.*) Megagametophytes. Plant Physiology 103: 477-483.

Mura A, Pintus F, Medda R, Floris G, Rinaldi AC, Padiglia A (2007). Catalase and antiquitin from Euphorbia characias: Two proteins involved in plant defense. Biochemistry 72: 501-508.

Obinger C, Maj M, Nicholls P, Loewen P (1997). Activity, peroxide compound formation, and heme d synthesis in Escherichia coli HPII catalase. Archives of Biochemistry and Biophysics 342: 58-67.

Preston TJ, Muller WJ, Singh G (2001). Scavenging of extra cellular H_2O_2 by catalase inhibits the proliferation of HER-2/Neu-transformed rat-1 fibroblasts through the induction of a stress response. Journal of Biological Chemistry 276: 9558-9564.

Scandalios JG, Guan LM, Polidoros AN (1997). Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant defenses. Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY. pp: 343-406.

Schulz AR (1994). Enzyme Kinetics. Cambridge University Press, Cambridge.

Tayefi-Nasrabadi H (2008). Catalytic properties of three catalases from kohlrabi (*Brassica oleracea gongylodes*). African Journal of Biotechnology 7: 472-475.

Woodbury W, Spencer AK, Stahman MA (1971). An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isoenzymes. Analytical Biochemistry 44: 301-305.

Zohary D, Hopf M (2000). Domestication of plants in the old World, third edition. Oxford: University Press. 211pp.

Some Biochemical Properties of Catalase from Safflower (*Carthamus tinctorius L.cv. I L-111*)

Tayefi-Nasrabadi H.[*] [1], Dehghan G.[2], Daeihassani B.[3], Movafegi A.[2], Samadi A.[4]

[1] Academic member of Sciences Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Academic member of Plant Biology Department, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3]PhD Student of Plant Biology Department, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[4]Academic member of Soil Sciences Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

Abstract

Safflower, *Carthamus tinctorius L.*, is a member of Asteraceae, cultivated mainly for its seed and flower, which are used as edible oil and for medicinal applications. Safflower is a resistant plant to the environmental stresses; therefore scientists use this plant as a model for studying the mechanism of plant resistance to the environmental stresses. Antioxidant enzyme system is one of the defense mechanisms that plants use for various environmental stresses. In this study some biochemical properties of catalase, an antioxidant enzyme system, from safflower and it sensivity to azide and cyanide was investigated. *Carthamus tinctorious* L.cv.IL-111 was grown hydroponically in perlite for 40 days and catalase was extracted from their leaves using phosphate buffer 0.1 M, pH 7.2. Study of pH profile, temperature and different concentration of substrate and inhibitors (azide and cynide) on catalase activity in Safflower and non-denaturant polyacrylamide gel electrophoresis of crude extract, showed that at least two isoenzymes of catalase were present in safflower leaves with optimal pH at 6.5 and 8.5, respectively. Isoenzyme active at pH 8.5 was more resistant to temperature in comparison to isoenzyme active at pH 6.5. Effects of inhibitors (azide and cynide) on catalase activity showed that isoenzyme active at pH 8.5 was more sensitive to both inhibitors (azide: 4.6 fold, and cynide: 2.6 fold) in comparison to isoenzyme active at pH 6.5.

***Key words**: Catalase, Safflower, kinetic, inhibitor, thermal stability*

[*]Corresponding author: H.Tayefi Tel.: 04113392378 E-mail: hossein_tayefinasrabadi@yahoo.com