

高级生化讲义

第二部份

酶

中国科学院生物化学研究所

1961年5月

高級生化讲义 第二部分

酶

第一章	引言
第二章	酶是蛋白質
第三章	酶的提純
第四章	辅酶和辅基
第五章	酶是催化劑
第六章	酶的分类和命名
第七章	活力測定的方法
第八章	基本动力学
第九章	抑制作用
第十章	PH的影响
第十一章	温度影响
第十二章	酶的专一性
第十三章	作用机制
第十四章	多酶系統
第十五章	糖代谢与脂肪代谢多酶系統
第十六章	細胞色素系統和呼吸鏈
第十七章	氧化磷酸化作用与巴斯德效应
第十八章	酶的生物学

第一章 引言 (提綱)

(一) 酶学研究的简单历史

(二) 酶是什么

a. 由生物体所产生的

内酶 { 酶
結酶
外酶

b. 具有高度專一性的催化劑.

c. 高分子物質.

(三) 酶的重要性

(四) 文献

教科书

1. Neilands J.B. & Stumpf, P.K. *Outlines of Enzyme Chemistry* 2nd. Ed 1958
2. Dixon, M. & Webb E. *Enzymes* 1958
3. Baldwin, E. *Dynamic aspects of Biochemistry*
4. Fruton, J. S. *General Biochemistry* 1958

参考书

1. *The Enzymes* 1st Ed by Sumner J.B. & K. Myrback (1951) Vol 1-2
2nd Ed. by Boyer P.D. & Lardy H. & Myrback, K. 1959 Vol 1-5
2. Colowick S.P. & Kaplan, N.O. *Methods in Enzymology* (1955) Vol 1-4

第二章 酶是蛋白質 (提綱)

在40年前，人们对于酶的化学性质，还没有确切的知識，但在那时，也已經有許多間接証据，說明酶和蛋白質的密切关係：

- (一) 酶的胶体性质。在溶液中，酶分子不能通过半透膜。
- (二) 电解质性质。在电场中能够移动的性质，说明酶分子带有电荷，同时酶活力和 pH 关系的曲线，也指出酶是电解质。
- (三) 加热失活作用。那时即已知道，酶对热不稳定，见热极易失去活力。酶失去活力这一反应的特点是反应速度随着温度上升而急速增加，活化能远

表 2-1 酶的遇热失活和蛋白质的热变性

	活化能, E. 卡	活化能, 度
胰蛋白酶	62,000	65
蔗糖酶	101,000	59
过氧化物酶	189,000	69
胃蛋白酶	75,000	65
白红肽	77,500	63
卵清肽	130,000	76

较一般化学反应为高。测定酶失活反应活化能的结果，说明其数值和蛋白质变性反应的活化能数值相似（表2—1），而一般化学反应的活化能则常在20,000卡左右。

- (四) 其他化学、物理因素对酶活力的影响。酶活力受表面活性剂，重金属，蛋白沉淀剂如三氯醋酸、磷钨酸或紫外光照射等因素影响而丧失的情况，也和蛋白质受这些因素影响而变性相似。
- (五) 蛋白水解酶作用。许多酶，如胰母素、胰酶，羧基

蛋白酶作用后即丧失活力。

(六) 提纯方法 一般使用的提纯酶的方法也和提纯蛋白质的方法相似。

虽然有许多间接证据说明酶和蛋白质的密切关系，但当时一些权威学者如德国的 Willstätter 等，都不认为酶是蛋白质。Willstätter 认为酶由活动中心 and 胶质载体两部分组成如下：

酶 = 活动中心 + 胶质载体 2.1

酶的催化能力和专一性等性质都由活动中心决定，而胶质载体的作用仅在于保护脆弱的活动中心，使其不易于受破坏而已。他认为存在于许多酶制剂中的蛋白质，只不过是起了保护胶体的作用，并依次说明许多酶在提纯过程中，纯度越高越不稳定的事实。Willstätter 并且宣称，在他把过氧化物酶提纯了 12,000 倍以后，溶液中已无蛋白质存在。现在我们知道，Willstätter 所使用的检定蛋白质的方法极不灵敏，难怪乎他在较稀的酶溶液中测不出蛋白质。但当时 Willstätter 以保护胶体的说法，否定了上述酶是蛋白质的全部间接证据，並以其“权威”性的意见，左右了当时生化界的看法。因此，在 1925 年出版的

Oppenheimer 的专著中，关于酶的化学性质有写道：“酶是一种化学性质不明的胶体物质”。

即使在 1926 年 Sumner 首先得到了结晶脲酶，並证明其为蛋白质以后，Willstätter 还认为 Sumner 得到的不过是一种蛋白质的结晶，其中含有少量脲酶作为杂质。但继 Sumner 以后 Northrop 又获得胃蛋白酶和胰蛋白酶结晶，並证明它们是纯净的蛋白质。迄今在已经高度提纯的百餘种酶之中，全部都是简单或复合蛋白质，不但如此，核糖核酸酶的全部氨基酸排列顺序，现在亦已阐明，目前已无人怀疑絕大多數的酶都是蛋白质这一结论。

但是否有个别的酶不是蛋白质？或其主要组成部分不是蛋白质？1951 年 Binkley 曾提出猪肾中之二肽酶是一种多核苷酸的说法，此后他虽然多少对原来的看法有些修正，即酶分子中也含有一些肽的成分，但仍认为其主要

組成部分是多核苷酸。

虽然除 Binkley 的工作外，所有的实验证据都证明酶是蛋白质，也有人企图从理论上说明，何以絕大多數的酶必需是蛋白質，但这些都不能排除，在已知但尚未提純，或未知的酶之中，也许有別的酶不是蛋白質的可能性。

参 考 文 献

Haldane, J. B. S. *Enzymes* 1930

Sumner, J. B. *J. Biol. Chem.* 69, 435 (1926)

Binkley, F., *J. Amer. Chem. Soc.* 82, 987 (1960)

第三章 酶的提純

在酶的研究中，提純是一非常重要的，有时是必不可少的手段。在机体中酶的种类常不下数百种，它们所催化的作用又有密切的关系，常通过底物、产物及辅酶等因素而彼此连接，相互制约，除机体中所含有的其他蛋白质外，它们本身也都是蛋白质，其組成大同小异。因此在研究酶的性質、作用、反应动力学、结构、结构与功能的关系等问题时，就必须使用高度純化的酶制剂以去除其他的酶或蛋白质的干扰。此外，在使用酶为高度专一的分析试剂时，也必须使用純淨的酶制剂。

由于迄今为止已知的酶都是蛋白质，因此一般常用的酶的分离提純方法，也就是常用來分离提純蛋白质的方法。但又因为酶具有催化活性，其物理化学性質又常因底物的存在与否而有所不同，故和一般蛋白质比较，酶的分离提純又有其特殊的方法和問題。此外，組織中含有酶的种类常不下数百种，酶的总量虽然还是不少，但每一种酶的含易却极微少。表3-1选择了几种酶在組織中的含易作为例子，从已经获得的实验結果来看个别的酶在組織中的含易常在百万分之一至百分之一之间。应该指出，已经知道其在組織中含易的酶，多半是那些含易较为丰富，提純较为容易的酶，随着酶提純工作的进展，可以想见，将发现大多数的酶在組織中的含易都是极为稀少的。因此这些酶的提純，将是更为艰巨的工作。

表3-1 某些酶在組織中的含易

酶	来源	含易(克/100克組織湿重)
胰蛋白酶	牛胰	0.65
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	兔骨骼肌	0.40
顺乌头酸酶	兔肌	0.16
过氧化物酶	豚鼠根	0.02
細胞色素C	肝	0.015
柠檬酸生台酶	猪心肌	0.07
脱氢核糖核酸酶	脑	0.0005

(一) 純化程度和产率

提純的目的是在於獲得一定量的，不含或你可減少含雜質的酶制劑，因此在提純過程中就應該知道經過每一提純步驟後，純度提高了多少和總回收量是多少。酶具有專一的催化活性這一性質，使我們有可能在一個錯綜複雜的混合物中，很迅速地測定出某一種酶的存在，並且比較在兩個不同制劑中的酶活性，就可以知道在這兩個制劑中酶含量的相對關係。酶活力常以在一定條件下，每單位重量的酶制劑，在一定時間內所引起的變化來表示。由於酶作用速度受其在作用時之環境如溫度、溶液之PH值、輔酶、激活劑和抑制劑的存在與否及其濃度等影響很大，因此，在決定酶活力單位時，必須對反應條件作明確的規定。各種條件對酶作用速度的影響，我們以後還將詳細討論。酶制劑的重量通常用毫克乾重，毫克蛋白或毫克蛋白質表示，酶制劑中的蛋白含量一般用雙縮脲法⁽³⁾，比濁法⁽⁴⁾，分光光度法⁽⁵⁾或用Folin-Ciocalteu試劑⁽⁶⁾測定，蛋白質則用Kjeldahl微量定氮法測定⁽⁷⁾。酶反應的程度則可用底物的減少，產物的生成或在酶反應過程中反應混合物的某些物理化學性質如光吸收、螢光、旋光度、粘度等的改變來表示。關於酶活力的測定將詳見第七章。

除上述的一般表示方法外，以下兩種表示酶活力的單位是文獻中常見的：

(1) Q 值：在某酶反應中，包含氣體的產生或吸收，如氧化酶類，過氧化氫放氧酶，脫羧酶等；這些酶的活力常用 Q 值表示。 Q 值的含義是每毫克酶制劑乾重，在一定作用條件下，一小時內所引起氣體變化的微升數。有在 Q 的右下角指明氣體的種類如 Q_{O_2} 表示氧氣變化的 Q 值， Q_{CO_2} 表示二氧化碳變化的 Q 值等。有時在 Q 的右上角指明反應進行時的大氣環境，如 $Q_{CO_2}^{N_2}$ 表示從氮氣為大氣時二氧化碳的變化。在酶制劑的重量是以蛋白質為單位時，則常在 Q 值後加括號注明，如 $Q_{O_2} (N)$ 。

表 3.2

酶	底物	分子	转椅	温度
氨基氧化酶	L-色氨酸	120,000	6	38
脂肪脱氢酶	在脱辅酶 A	100,000	150	30
脂酰基酶	乙醇	75,000	220	20
氨基酸氧化酶	谷氨酸	39,000	1000	25
氨基酸氧化酶	L-丙氨酸	1,000,000	2,900	25
氨基酸氧化酶	L-丙氨酸	62,000	3,100	38
氨基酸氧化酶	苯丙氨酸	50,000	4,200	30
氨基酸氧化酶	苯丙氨酸	34,000	5,500	25
氨基酸氧化酶	D-甘油醛-3-磷酸	120,000	6,700	27
氨基酸氧化酶	D-甘油醛-2-磷酸	64,000	9,900	20
氨基酸氧化酶	葡萄糖-1-磷酸	74,000	12,000	30
氨基酸氧化酶	葡萄糖-6-磷酸	97,000	13,000	30
氨基酸氧化酶	葡萄糖-3-磷酸	81,000	16,000	30
氨基酸氧化酶	葡萄糖-5-磷酸	60,000	19,000	30
氨基酸氧化酶	葡萄糖-6-磷酸	150,000	27,000	20
氨基酸氧化酶	D-甘油醛-3-磷酸	120,000	28,000	20
氨基酸氧化酶	乳酸	126,000	35,000	24
氨基酸氧化酶	乳酸	81,000	40,000	30
氨基酸氧化酶	乳酸	204,000	100,000	20
氨基酸氧化酶	乳酸	280,000	460,000	20
氨基酸氧化酶	乳酸	250,000	5,000,000	20
氨基酸氧化酶	乳酸	3,000,000	18,000,000	25
氨基酸氧化酶	乳酸	232,000	19,000,000	0
氨基酸氧化酶	乳酸	30,000	96,000,000	0

(2) 转换率 (Turnover Number, T.N.): 为了比较不同类型的酶的催化能力或比较酶和其他催化剂的催化能力, 就必需用克分子易来作为酶的全量单位。转换率的定义是: 在一定温度下, 每一克分子的酶在最适作用条件下一分钟内所催化的底物变化的克分子数。因为酶的全量以克分子易为单位, 故仅对分子易为已知的纯酶制剂才有可能计算其转换率。但某些含有辅基的酶, 则可根据辅基的测定计算以每克分子辅基为单位转换率, 不过这时必需首先肯定经过提纯的酶制剂中所含有的辅基都是属于这个酶, 而不是属于其他杂质的。对于已经高度提纯的酶制剂, 有时也可以假定其分子易为 100,000 而大体上估计其转换率的数量级。从表 3、2 可以看到相当多的酶的分子易都是在 100,000 左右, 说明这样估计的结果, 可能不会与实际数字相去过远。表 3、2 还列举了某些酶的转换率。

(见表 3、2)

以上所介绍的都以每单位重量的酶为基础而计算的活力通称为比活力, 比活力愈高则表示酶的纯度愈高。在提纯过程中的另一重要因素是酶活力的总回收量, 可以从比活力乘以酶制剂的总乾重求得, 酶制剂的总活力也可以不经过乾重的测定从每单位容积的酶制剂的活力乘以酶制剂的总容积求得。

理想的提纯方法是比活力的提高越多越好, 总活力的回收越高越好。但是实际上前者两者不可兼得, 因而不得不在比活力多提高一些和总活力多回收一些之间, 作出适当的选择。

(二) 选择材料

在着手提纯某一个酶之前, 除了某些为了一定的目的, 如比较不同生物体中或比较正常和在病理状况组织中某一个酶的性质, 必需限定用某一种材料外, 首先要决定的是要选择适当的原材料。在选择原材料时, 所必需考虑的因素如下

(1) 取材容易, 上面说过, 在机体中每一种酶的含量一般在百分之一以下, 因此为了取得足够的纯净的酶制剂

供研究之用，常不得不在提纯工作开始时，使用较大量的生物组织作为原料。除了少数含酶较丰、提纯较易的酶以外，在大多数情况下，所需用的原料不少于一公斤。这样取材方便就成为选择材料时应该首先考虑到的因素。在已经制得结晶的一百多种酶之中，从常见的哺乳动物，特别是供肉食用的动物来源制得的占半数以上⁽⁸⁾，实在不是偶然的。自微生物制备的酶，也由于同样的考虑，多数选用工业上常用的酵母或霉菌为原料。

(2) 含酶丰富：同一种酶，在同一动物的不同器官中，或在不同动物的同一器官中，含量可以不同，有时甚至相去甚远。从 Dixon 和 Webb 收集的四十余种酶在动物组织中的分布资料看来⁽⁸⁾，通常在同一动物的不同器官对某一种酶的含酶相差比较大，而不同动物的同一器官则相差较少，但即使后者，其差别有时也可能达到几十倍乃至几百倍。如 D-氨基酸氧化酶在羊肾中最为丰富，含酶较猪肾高数倍，较马肾则高百倍以上。又如在小白鼠小肠中精氨酸酶活力很强，但在大白鼠、豚鼠或兔等动物小肠中却全无这一酶活力。选择一个含酶丰富的来源作为材料，不但自同样重量的原料中可以取得较多量的酶，并且所要求的提纯倍数也较低，这样就有可能简化提纯的过程。有时特别是选用微生物为材料时，可以利用适应酶的生成在提取前大大地增加其酶含量。在选用植物材料时应特别注意其酶含量的季节性变化。

(3) 其他因素：某些酶在机体中是和细胞中的颗粒体紧密结合的，由于不容易使它们溶介，因而也不容易使它们和其他与颗粒体结合的酶分离而达到提纯的目的。但在有时在另一机体中功能相同的酶却较易溶介，选择这样的材料就较易得到提纯的酶。如酵母己糖激酶⁽⁹⁾，虽然动物组织的己糖激酶的含量至少不低于酵母，却由于其与颗粒体紧密结合，并较不稳定迄今尚未能提纯。

此外酶是否稳定，所选用的组织中是否有干扰性物质存在等都应予以适当的注意。

(三) 提取

在动植物组织腐败变质过程中酶含量常有损失，微生物材料放置过久，其酶活力亦可能降低，因此取用的材料应尽可能越新鲜越好，提取工作一般应在获得材料后立即开始。如不可能立即开始而必需放置一定时间，则应在较低的温度下保存，在-15度左右冷冻保存，是一个比较安全的方法。

(1) 磨碎，破坏细胞：动植物组织一般用绞肉机绞碎即可使用，有时为了抽提比较完全，需要将组织磨碎得比较彻底，则可以使用高速组织捣碎机 (Waring Blendor) 或加砂研磨。高速组织捣碎机使用比较方便，但由于其用以切碎组织的刀片转动速度甚高，易于导致酶蛋白的变性，故有时不能使用，在用肌肉组织为材料时，以绞肉机绞碎再加砂研磨为最好的方法，组织量较少时，也可以使用玻璃匀浆器。

加砂研磨也可以用在微生物材料上，不过需要使用较均匀的细砂，有时也以玻璃粉或氧化铝粉代替，但后者可能导致酶蛋白的吸附。酵母细胞壁较厚，不易磨碎故自酵母提取酶制剂常将酵母悬浮液保温，使其自溶后，再进行抽提，如自酵母提取己糖激酶⁽⁹⁾或醇脱氢酶⁽¹⁰⁾时，都先使酵母自溶。此外，用微生物为材料时，还时常使用声波或超声波振荡⁽¹¹⁾，加研磨剂后高速振荡⁽¹²⁾，冷冻后研磨⁽¹³⁾或用溶菌酶⁽¹⁴⁾以破坏其细胞壁。自微生物制备无细胞抽提液是一个比较困难的问题，所使用的方法应随材料和目的而有所不同，常用的方法可以参看 Gunzalus^的介绍^[15]。

(2) 丙酮粉：将新鲜组织立即用过量丙酮处理也是一种破坏细胞膜的有效方法。把经丙酮处理过的组织吹干，磨碎及过筛后就得到通常叫做丙酮粉的半制品。除了破坏细胞膜以便于内酶 (endoenzyme) 的抽提外，丙酮粉的制备还有以下几点好处：由于其含水量甚低，比较稳定，易于储存，特别是在低温和干燥状况下，可以保至相当时期，以备在需用时随时取用。其次，丙酮是一个相当好的

脂肪溶剂，制成丙酮粉后，脂質已除去，在分离提純过程中可以避免脂質的干擾。此外，对于某些与細胞顆粒体紧密結合不溶于水的酶，將組織先制成丙酮粉以除去脂質后，有时能使原来不溶的酶溶于水。例如 *Singer* 和 *Kearny* 等 [16] 即曾利用此法自牛心线粒体丙酮粉中抽出琥珀酸脱氢酶。

制备丙酮粉时应注意之点是操作过程应尽可能的短，操作温度应維持在零度或以下。但即使如此，某些酶仍可能被丙酮破坏。在这种情形下丙酮法的制备不能应用。

(3) 抽提：对于胞酶 (*Cyoenzymes*)，自磨碎的組織或細胞直接用水、盐溶液，或緩冲液抽提即可。值得注意的是抽提时的 pH 值有时对于产率很有关系，例如在自兔骨骼肌中抽提甘油醛-3-磷酸脱氢酶时，用稀 KOH 溶液抽提较用水抽提获得大得多的收量 [17]。某些酶在酸性溶液中比较稳定，这时如用稀酸抽提 [18]，则仅溶出什质较少，就便于以后提純。

在結酶 (*desmoenzymes*) 中，有些酶虽然在細胞内是与顆粒体結合的，但結合不甚紧密，顆粒体結構受到損害时，即被释放在溶液中。这些酶的抽提，都没有特殊的困难，如： α -酮戊二酸脱氢酶和延胡索酸酶的抽提都可以用緩冲液抽提 [19] [20]。細胞色素 c 虽然和线粒体結合较紧，但用三氯乙酸破坏线粒体 [21]，或仅提高溶液的离子强度 [22] 即可达到抽提的目的。

对于与顆粒体結合紧密不易使之溶介的酶，除少数能自丙酮粉抽提外 [16]，*Morton* 所用的正丁醇处理法 [23]，常常是一个有效的方法。最近 *Morton* 对于碱性磷酸酯酶 [24] 和汪、邹和王对于琥珀酸脱氢酶的提純 [25] 都使用了这一方法。最后还有一部分結酶，用以上各种方法均不能使之溶介，在这种情形之下，某些作者採用了在胆酸盐溶液中进行分离的方法，如近年来对于提純細胞色素氧化酶的尝试即是在胆酸盐溶液中进行 [26]。这些尝试在一定程度上也获得一些有益的结果，但迄今为止，还没有用这种方法达到过完全提純的目的；这可能是因为胆酸盐

虽然能使颗粒体的悬浮液变清，但酶究竟仍不是处于真正的溶解状态之故。

(四) 分离和提纯

粗抽提液中除有所需要提纯的酶以外，尚含有大量的，一般通称之为“什质”的许多高分子及小分子物质。其中小分子什质，在提纯过程中酶蛋白经过沉淀，吸附等步骤，通常能够比较容易除去，在必要时也可以经过透析，使其与酶蛋白分离。高分子什质中，除蛋白质外，尚可能有核酸及少量矿物质。核酸可以用氯化锰^[27]或鱼精蛋白硫酸盐^[28]沉淀法除去，必要时也可以用核酸酶处理除去^[29]，特别是在自微生物来源制得的抽提液中，核酸含量较高，必须设法除去。

除去这些什质之后，酶的提纯工作实质上是一个在大量的许多种类的蛋白质混合物中，分出其中的占总蛋白量很少的一种。在提纯过程中以下几点是应该予以注意的：首先，由于酶的蛋白质特性，除少数例外，一般是对热不稳定的，更由于随着酶的逐渐提纯，什蛋白逐渐除去，总的蛋白浓度逐渐降低，蛋白质间的互相保护作用也逐渐减少等原因，酶越纯，其稳定性也越差。因此在提纯过程中应尽可能保持较低的温度。在过滤或搅拌等操作过程中，还应该防止泡沫的生成，以避免酶蛋白的表面变性。重金属离子，对某些酶有破坏作用，也应尽量避免。

其次，即使是在按照一个已知的方法提纯某一个酶的时候，也应该在每一提纯步骤后，分别测定取用以及准备弃去部分的总活力和比活力。由于生物材料的品种可能不同，试剂纯度及实验条件可能不完全相同，酶的分离情况也可能和文献所记载的不完全一致，盲目按照文献操作，常导致提纯工作的失败，并且失败之后，也无从检查失败原因以总结经验，吸取教训，只有在用同一方法，在同一实验室中，成功地完成了某一种酶的提纯不只一次之后，才能逐渐略去在提纯过程中的活力测定。

最后，实验条件的严格控制，往往也是成功与失败之间的关键问题。除温度的控制外，溶液的PH值及离子强

度时蛋白质的溶介度，吸附性质及带电性质都有很大影响。蛋白质本身的浓度也是一个值得注意的问题，例如在使蛋白质沉淀时所求用的条件，往往不是使其全不溶解，而仅是减少其溶介度至一定的程度，这样一个浓的蛋白溶液的沉淀就会比一个稀的蛋白溶液更为完全。

目前所经常使用的提纯方法大约有一盐析、有机溶剂沉淀，等电点沉淀，吸附，离子交换，选择性地使蛋白质变性及电泳等。

(1) 盐析：利用不同蛋白质在高浓度的盐溶液中溶介度有不同程度的降低来进行。盐析是在酶的提纯中使用得最早的方法之一，但迄今仍是使用得最广泛的方法。盐析法的优点是简便、安全、应用范围广泛，并且确实能达到一定的提纯目的。多数酶在高盐浓度的溶液中还较在低盐浓度的溶液中为稳定，因此在操作过程中比较不容易引起酶蛋白变性而失去活力。有时甚至无需保持低温，能在室温下进行分离，这样就大大简化了操作过程。盐析生成的沉淀也易于过滤。

使用得最多的盐当首推硫酸铵。主要的原因是溶介度较高，饱和溶液的浓度约为 4 M，能将绝大多数酶蛋白析出之故。此外有时也使用氯化钠、硫酸钠、硫酸镁等。

蛋白质在高浓度的盐溶液中的溶介度和溶液离子强度的关系如下式所示 [30]：

$$\log S = B - KI$$

其中 S 为溶介度，B 及 K 为常数，I 为溶液之离子强度。B 随溶液之 pH 值及温度而变，K 值则不变，这些因素的影响，但 K 值因所用电介质的性质不同而有所不同。因此在选定一种电解质进行盐析时，pH 值及温度必需很好地予以控制。硫酸铵溶液的 pH 值常在 4.5—5.5 之间，但有时市上购得之硫酸铵中含有游离硫酸，pH 值可能降至 4.5 以下。需要用硫酸铵在其他 pH 进行分离时，可以用硫酸或氨水调节，调节后之浓硫酸铵溶液 pH 值一般先稀释 10 倍，然后用指示剂或 pH 计测量。

硫酸銨溶液的濃度，一般常以飽和度（以飽和溶液為1）表示。在所需要達到的硫酸銨濃度不太高時，以在不斷攪拌下徐徐加入一預先配制的硫酸銨飽和溶液為較好，這樣可以防止溶液中局部濃度過高。為達到一定飽和度所需要的飽和硫酸銨溶液的容積，可以用下式計算：

$$V = V_0 \cdot \frac{S_2 - S_1}{1 - S_2} \quad (3.2)$$

其中V及 V_0 各為所需用飽和硫酸銨溶液及原溶液的容積， S_2 及 S_1 各為所需達到的及原溶液的飽和度。嚴格說來，由於混合兩濃度不同的硫酸銨溶液時容積的變化，或3.2不是完全準確的，但其誤差常在2%以下。一般應用亦已足夠，當所需要達到的飽和度較高，加入飽和溶液增加總容積甚大時，則以加入固體硫酸銨比較方便。此時應注意的是，所用固體應事先研碎，徐徐分批加入並不斷攪拌，等先加入之固體完全溶解后再加入次一批。所需用之硫酸銨重量可以由式3-3計算⁽³¹⁾：

$$X = \frac{G(S_2 - S_1)}{1 - AS_2} \quad (3.3)$$

其中X是將1升飽和度為 S_1 的溶液提高至飽和度為 S_2 所需用的硫酸銨重量（克），G及A為常數，其數值G在0度為707，在20度為756，A在0度為0.27，在20度為0.29。

鹽析生成之沉淀，最好放置至少15分鐘，使其沉淀完全，再進行分離。所採用的分離方法，呈視不同情況而不同，但一般說來，低鹽濃度時在离心机中較為沉降但不須過濾，高鹽濃度時在离心机中較難沉降，有時必需使用高速离心机，但過濾卻比較容易。過濾不須特殊設備，要求低溫時，也可以在冷室或冰箱中進行，但所需時間較長，不如离心法可以迅速達到分離目的。

(2) 有機溶液沉淀：近年來使用有機溶劑進行分離日益普遍，其主要的優點是分辨能力比鹽析法高，一種蛋白質能在一比較狹窄的有機溶劑濃度範圍內沉澱出來，因而較易達到提純的目的，缺點是高濃度的有機溶劑常引起

酶活性的丧失，所以分离必须在低温进行，在加入有机溶剂时搅拌均匀，以避免局部浓度过高，也远较使用盐析法更为重要。析出的沉淀一般容易在离心机中沉降，用短时间的低温离心分出沉淀后，应立即用水溶解溶化，以降低有机溶剂浓度，避免酶活性丧失。用有机溶剂进行分离除 pH 值及蛋白原浓度应注意外，溶液的离子强度是一个特别重要的因素，过高则分离结果不好，全无蛋白原存在则沉淀不易在离心机中沉降，一般在离子强度为0.05或稍低为最好，并且一经确定，必需严格控制，才能每次得到有重复性的结果。

乙醇和丙酮是两种使用得最广泛的溶剂。Askonas在比较了几种有机溶剂对于肌肉抽提液中某些酶的分离后，认为丙酮是其中最好的溶剂⁽³²⁾。有机溶剂浓度通常以有机溶剂和水的容积比表示。

(3) 等电点沉淀：蛋白质一般在其等电点附近溶介度为最低，但由于通常即使在等电点附近，蛋白质仍有一定的溶介度，沉淀尚不完全，故等电点沉淀在酶的分离提纯中，除少数特殊情况如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的提纯外⁽³³⁾，

应用较少。但有时把等电点沉淀和盐析结合能得到良好的结果，如D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶在饱和度为0.7的硫酸铵溶液中，当 pH 值用浓氨水调节至8.3时，即结晶析出⁽¹⁷⁾。

动物组织的粗抽提液常有颗粒悬浮其中，此时如调节 pH 至5，离心分去沉淀，即可得到一澄清的溶液。

(4) 吸附：在酶的提纯方法中，选择性的吸附不仅是历史最久的，同时迄今仍为最重要的方法之一。早期的工作中常用高岭土，氧化铝及活性炭等无机化学制备中使用的吸附剂，这些吸附剂或者吸附能力较弱，或者较易引起酶活性的丧失，现在已逐渐为凝胶性的吸附剂代替。氢氧化铝凝胶和Willstätter所首先使用的磷酸钙凝胶⁽³⁵⁾，是当前使用得最广泛的吸附剂，此外氢氧化钙凝胶也有时使用。

吸附剂的应用可以有两种方法，当酶较易吸附时，可