

第八章 固定化酶及固定化细胞

第一节 酶的固定化

第二节 辅酶的固定化

第三节 细胞的固定化

第四节 原生质体的固定化

为什么要固定酶？

➤ 酶的优点和缺点

优点：高催化效率；高专一性。

缺点：对环境十分敏感；易失活；不能回收。

➤ 固定化生物催化剂的优点

与底物产物分开

能回收，可反复使用

易于连续化、自动化

第八章 固定化酶及固定化细胞

第一节 酶的固定化

第二节 辅酶的固定化

第三节 细胞的固定化

第四节 原生质体的固定化

一、酶的固定化

1. 固定化酶的历史
2. 固定化酶的定义
3. 固定化酶的制备原则
4. 酶的固定化方法
5. 固定化酶的性质
6. 影响固定化酶性能的因素

1、固定化酶的历史

- 1953年，Grubhofev和Schleith首先开始了酶固定化研究，并第一次实现了酶的固定化。
- 1960年，日本的千畑一郎开始了氨基酰化酶固定化研究，开始了将固定酶应用在工业上的第一步。
- 1969年，千畑一郎成功地将氨基酰化酶反应用于DL-AA的光学分析，实现了酶连续反应的工业化。这是世界上固定化酶用于工业的开端。
- 1973年，千畑一郎再次在工业上成功地固定化大肠杆菌细胞，成功实现了L-天冬氨酸连续生产。

2、固定化酶的定义

- 采用各种方法，将酶固定在水不溶性的载体上，制备成固定化酶的过程称为**酶的固定化**。
- 固定在载体上并在一定的空间范围内进行催化反应的酶称为**固定化酶**。

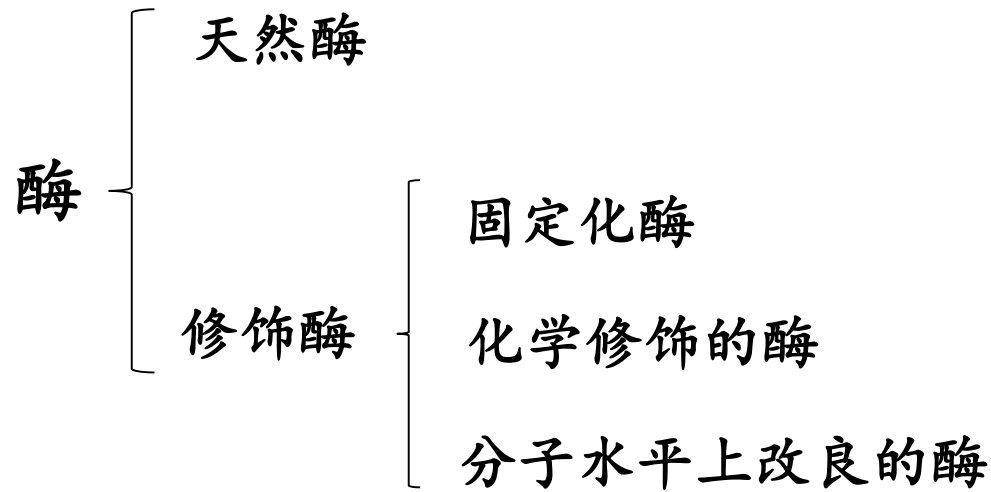
固定化酶的优点

- 易与底物、产物分开
- 可以在较长时间内进行反复分批反应和装柱连续反应
- 提高酶的稳定性
- 酶反应过程能够加以严格控制
- 产物溶液中没有酶的痕迹，简化了纯化工艺
- 较游离酶更适合于多酶反应
- 可以增加产物的收率，提高产物的质量
- 酶的使用效率高，成本降低

固定化酶的缺点

- 固定化时，酶活力有损伤
- 增加了生产的成本
- 只能用于可溶性底物，而且较适用于小分子底物，对大分子底物不适宜
- 与完整菌体相比不适宜于多酶反应，特别是需要辅助因子的反应
- 胞内酶必须经过酶的分离手续

酶的分类



By 1971年国际酶工程会议

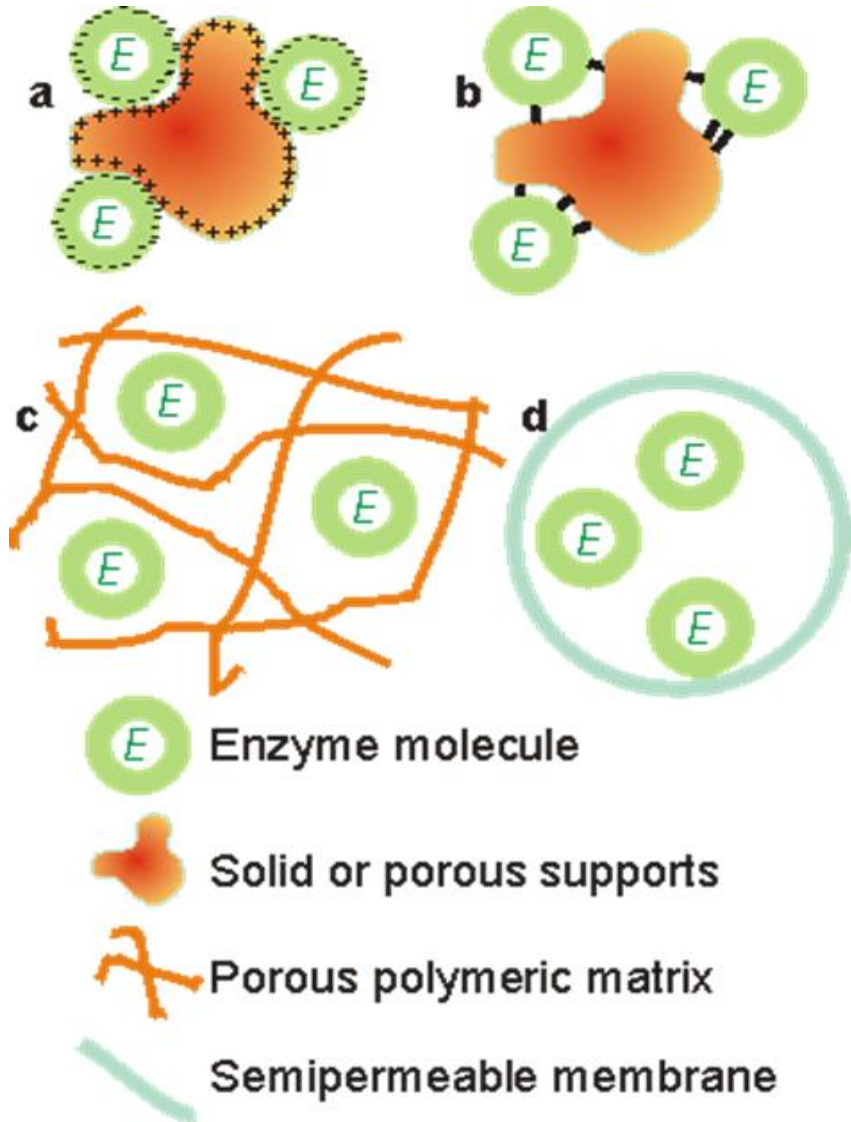
3、固定化酶的制备原则

- ① 必须注意维持酶的催化活性及专一性。
- ② 应该有利于生产自动化、连续化。
- ③ 固定化酶应有最小的空间位阻，尽可能不妨碍酶与底物的结合，以提高产品的产量。
- ④ 酶与载体结合必须牢固，从而使固定化酶能回收贮藏，利于反复使用。
- ⑤ 固定化酶应有最大的稳定性，所选载体不能与废物、产物或反应液发生化学反应。
- ⑥ 低成本，以利于工业使用。

4、酶的固定化方法

固定化方法	分类
非共价结合法	结晶法 分散法 物理吸附法 离子结合法
化学结合法	交联法 共价结合法
包埋法	微囊法 网格法

四种主要的固定化酶方法



- a 吸附法（非共价结合）
adsorption
- b 共价结合法
covalent binding
- c 网格法
entrapment
- d 微囊法
membrane confinement

(一) 非共价结合法

1. 结晶法

使酶结晶而实现固定化的方法。

载体就是酶的本身，提供了非常高的酶浓度。不足的是使用中酶会有损耗。

2. 分散法

酶分散于水不溶相中而实现固定化。

对于在水不溶的有机相中进行的反应，最简单的固定化方法就是将干粉悬浮于溶剂中，通过过滤或离心的方法将酶进行分离和再利用。

3. 物理吸附法

酶被物理吸附于不溶性载体的一种固定化方法，是通过载体表面和酶分子表面间的**次级键相互作用**而达到固定目的的方法。

优点：对酶影响小。只需将酶液与具有活泼表面的吸附剂接触，再经洗涤除去未吸附的酶便能制得固定化酶。是最简单的固定化技术，在经济上也最具有吸引力。

缺点：作用力弱，易脱落。

4. 离子结合法

- 酶通过离子键结合于具有离子交换基的水不溶性载体。
- 阴离子交换剂：如二乙基氨基乙基 (DEAE)-纤维素、四乙氨基乙基 (TEAE)-纤维素、DEAE-葡聚糖凝胶等。
- 阳离子交换剂：如羧甲基 (CM)-纤维素、纤维素柠檬酸盐、Amberlite CG50、IRC-50、IR-200、Dowex-50等。
- 例如1969年最早应用于工业生产的固定化氨基酰化酶就是使用多糖类阴离子交换剂DEAE-葡聚糖凝胶固定化的。

(二) 化学结合法

1. 共价结合法

- 酶与载体以**共价键结合**的固定化方法，是载体结合法中报道最多的方法。
- 可以将载体有关基团活化，也可在载体上接一个双功能基团，然后将酶偶联上去。
- 结合牢固，但反应条件苛刻，操作复杂，会引起酶蛋白高级结构变化，破坏部分活性中心，及底物专一性。
- 往往不能得到比活高的固定化酶，酶活回收率一般为30%左右

可与载体共价结合的酶的功能团

— α 或 ϵ 氨基 ($-\text{NH}_2$)、 α 、 β 或 γ -羧基 ($-\text{OH}$)、巯基 ($-\text{SH}$)、羟基 ($-\text{COOH}$)、咪唑基、酚基等。

—参与共价结合的氨基酸残基不应是酶催化活性所必需的，否则往往造成固定后的酶活性完全丧失。

所用载体分三类

—天然有机载体（如多糖、蛋白质、细胞）

—无机物（玻璃、陶瓷等）

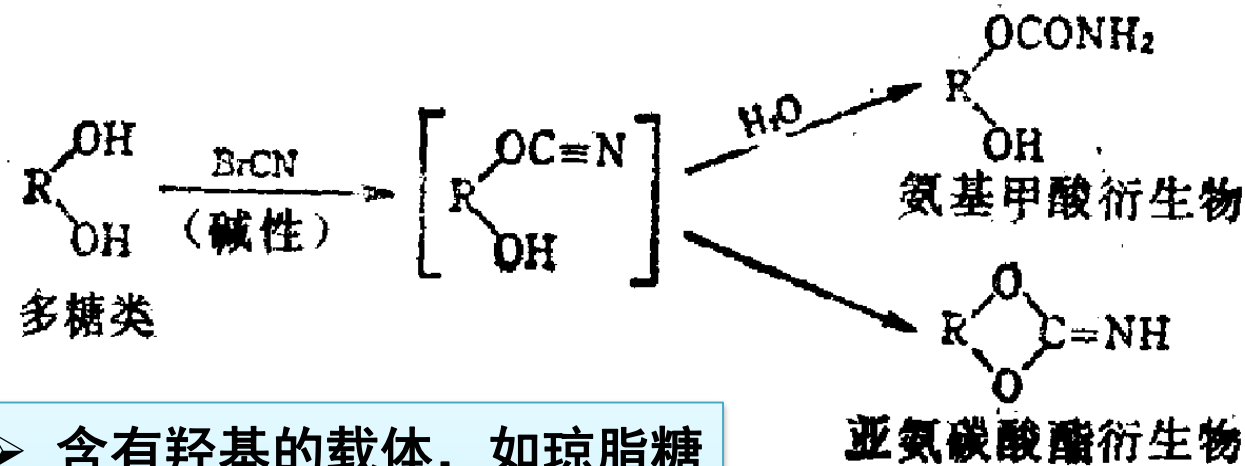
—合成聚合物（聚酯、聚胺、尼龙等）

载体的活化方法依载体性质各不相同

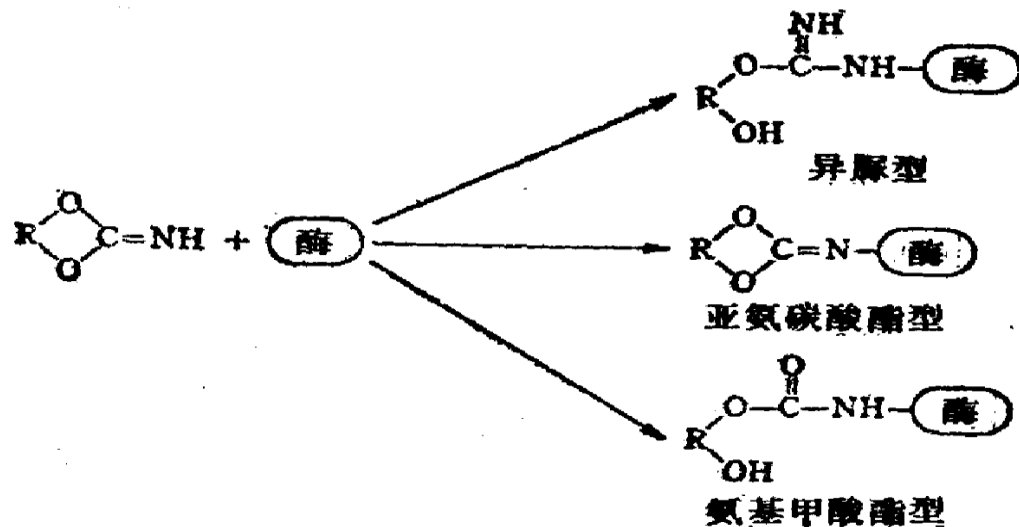
羟基聚合物

纤维素、葡聚糖、琼脂糖及胶原等可用溴化氰法、烷基化法等。

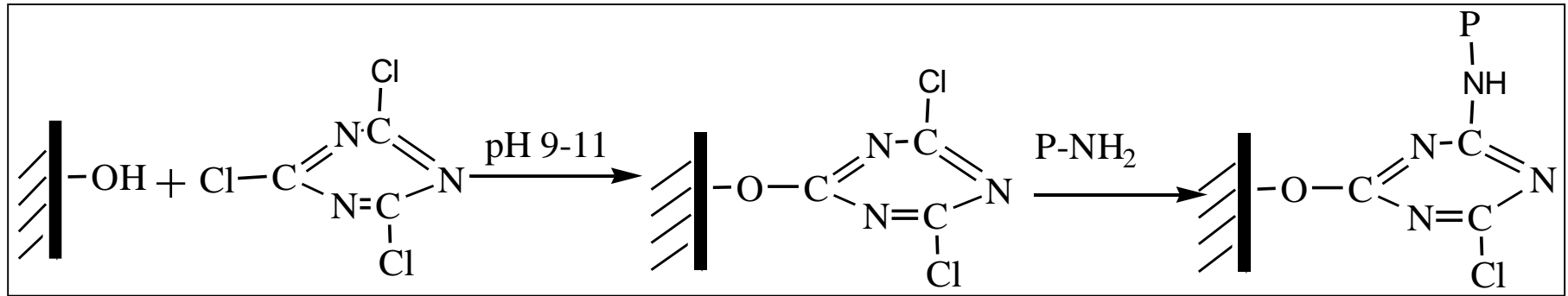
溴化氰法



- 含有羟基的载体，如琼脂糖凝胶，葡聚糖凝胶，可用溴化氰活化生成亚氨基碳酸衍生物。
- 活化的载体上的亚氨基碳酸基团在弱碱条件下，可与酶分子上的氨基反应，制成固定化酶。



烷基化法



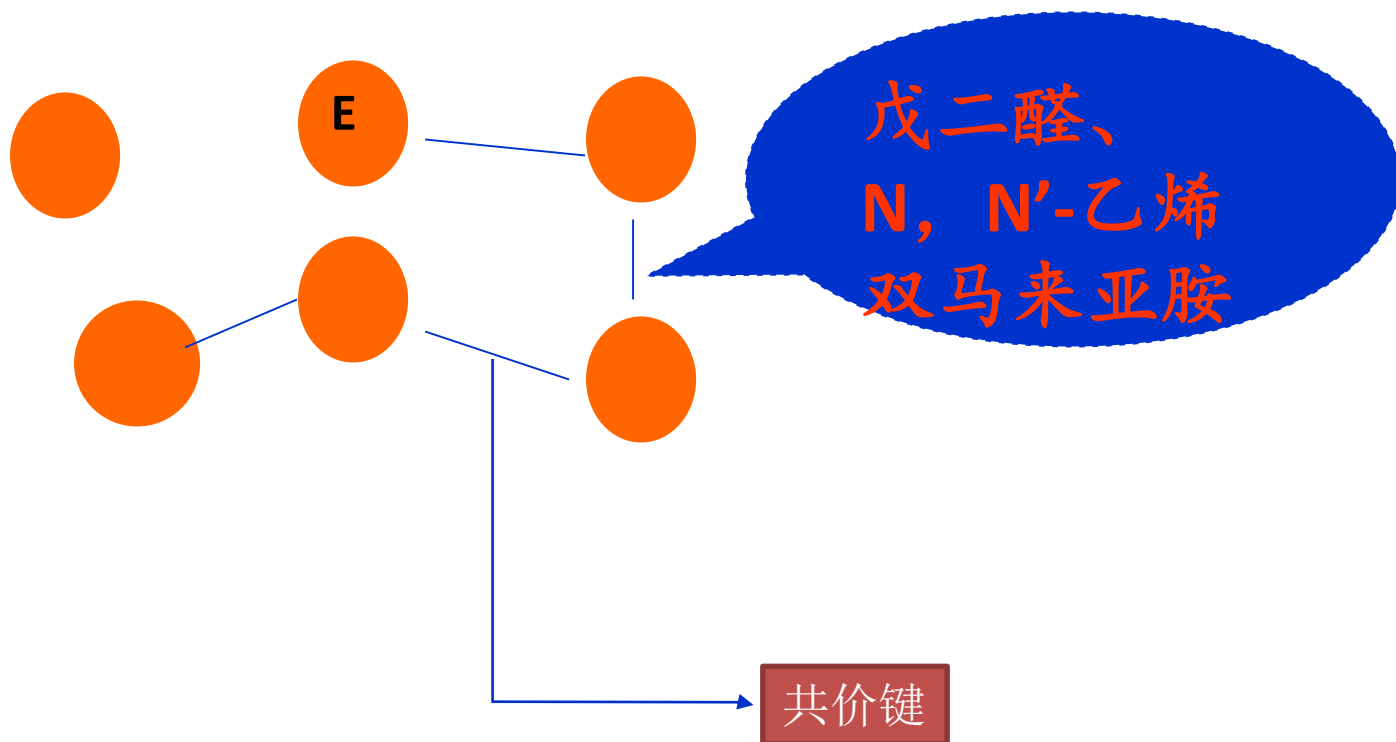
三氯-均-三嗪

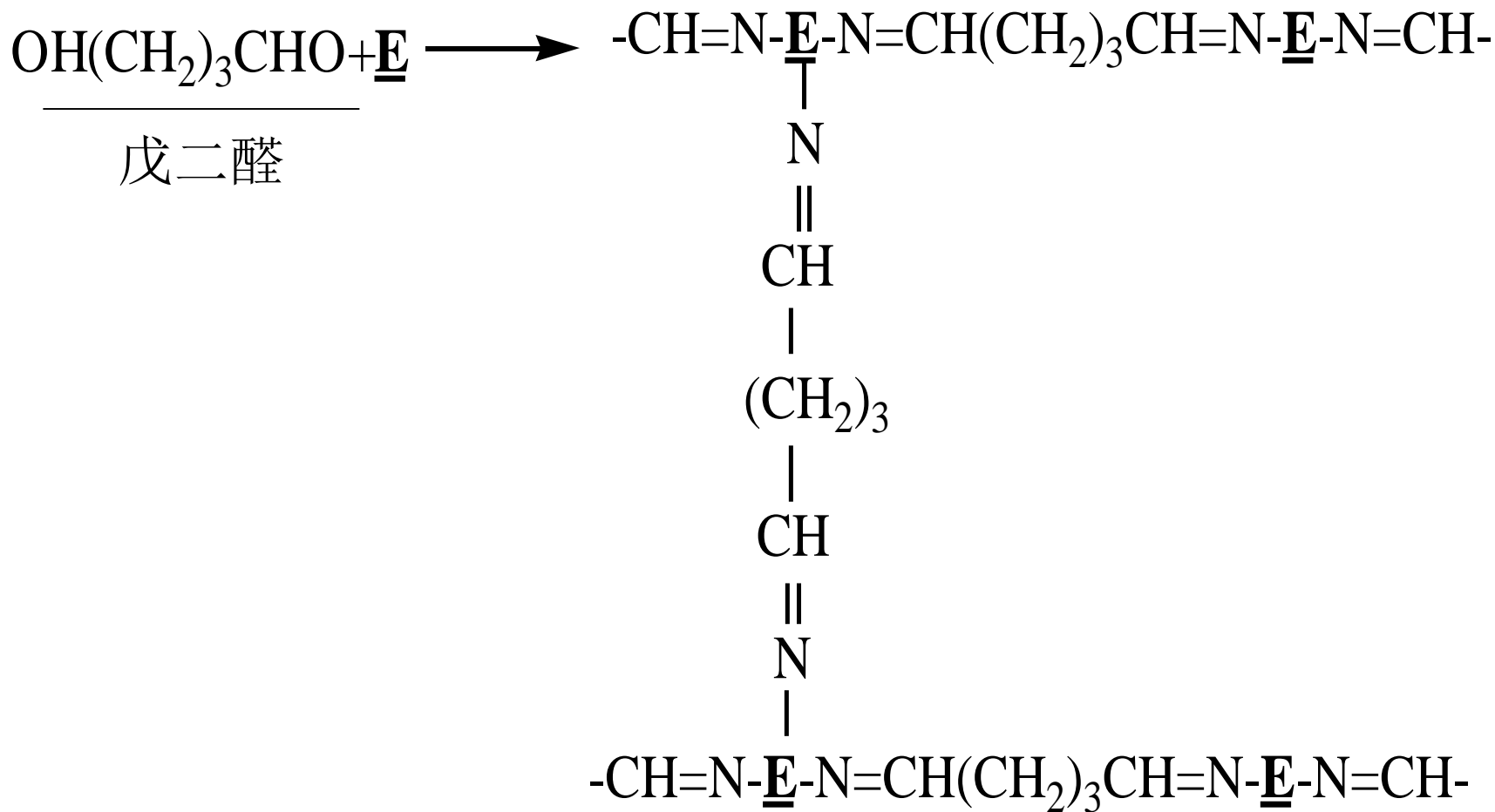
三氯-均-三嗪纤维素

- 含羟基的载体也可用三氯-均-三嗪等多卤代物进行活化，形成含有卤素基团的活化载体。
- 活化载体上的卤素基团可与酶分子上的氨基，巯基，羟基等发生烷基化反应，制备成固定化酶。

2. 交联法

- 就是用双功能或多功能试剂使酶与酶或微生物与微生物细胞之间交联的固定化方法。
- 交联法反应条件比较激烈，固定化的酶活回收率一般较低。





- 戊二醛有两个醛基，都可与酶或蛋白质的游离氨基反应，形成席夫碱，而使酶或菌体蛋白相互交联，制成固定化酶或固定化载体。

(三) 热处理法

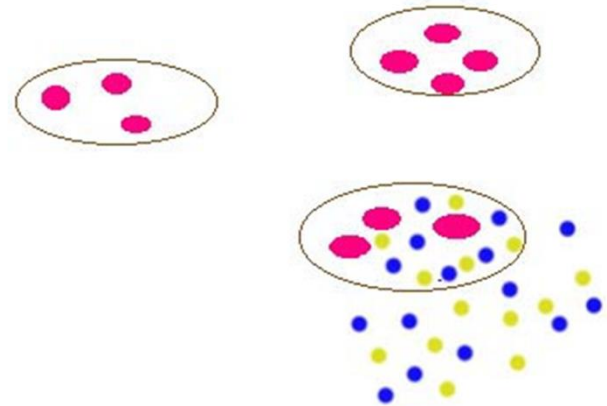
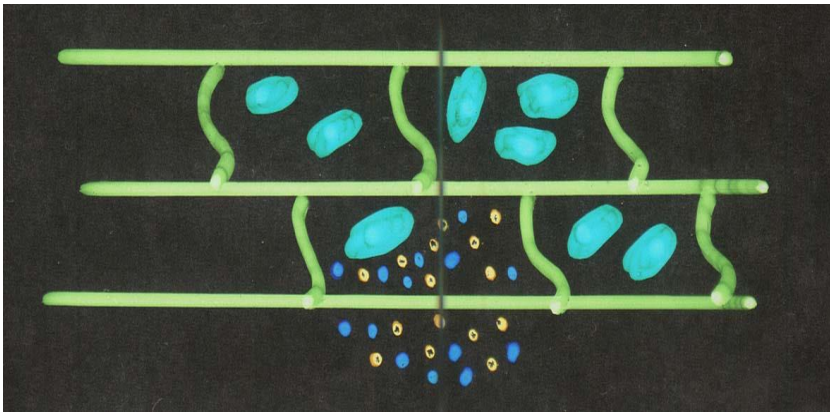
- 热处理法是将含酶的细胞在一定温度下加热处理一段时间，使酶固定在菌体内，而制备得到固定化酶的方法。
- 热处理法只适用于那些热稳定性较好的酶的固定化

例如：将培养好的葡萄糖异构酶的链霉菌细胞在65度处理15min，葡糖糖异构酶全部固定在菌体内。

热处理法可与交联法或其它固定方法联用，进行双重固定化。

(四) 包埋法

- 将酶或微生物包埋在高分子凝胶细微网格中的称为**网格型**
- 将酶或微生物包埋在高分子半透膜中的称为**微囊型**



包埋法特点

- 包埋法一般不需要与酶蛋白的氨基酸残基进行结合反应，很少改变酶的高级结构，酶活回收率较高。
- 但是在包埋时发生**化学聚合反应**，**酶容易失活**，必须巧妙设计反应条件。
- 由于只有**小分子**可以通过高分子凝胶的网格扩散，并且这种扩散阻力还会导致固定化酶动力学行为的改变，降低酶活力。
- 因此，包埋法只适合作用于**小分子底物**和**产物**的酶，对于那些作用于大分子底物和产物的酶是不适合的。

常用的载体材料

1. 网格型

—聚丙烯酰胺、聚乙烯醇和光敏树脂等**合成高分子化合物**, 常采用单体或预聚物在酶或微生物存在下聚合的方法

—淀粉、蒟蒻粉、明胶、胶原、海藻酸和角叉菜胶等**天然高分子化合物**, 在酶或微生物存在下凝胶化

网格型包埋法是固定化微生物中用得最多、最有效的方法。

2. 微囊型

— 通常直径为几微米到几百微米的球状体，颗粒比网格型要小得多，反应条件要求高，制备成本也高。

— 制备微囊型固定化酶方法。

(1) 界面沉淀法

(2) 界面聚合法

(3) 二级乳化法

界面沉淀法

—利用某些高聚物在水相和有机相的界面上溶解度极低而形成皮膜将酶包埋。

特点

—条件温和，酶失活少，

—但要完全除去膜上残留的有机溶剂很麻烦。

作为膜材料的高聚物有硝酸纤维素、聚苯乙烯和聚甲基丙烯酸甲酯等。

固定化酶(细胞) 应用实例

固定化酶和固定化细胞	应用	生产时间
氨基酰基转移酶	DL-氨基酸的旋光度解析	1969
葡萄糖异构酶	将葡萄糖异构变为果糖	1973
青霉素酰胺酶	生产6-APA	1973
天冬氨酸酶	生产L-天冬氨酸	1973
延胡索酸酶	生产L-苹果酸	1974
β -半乳糖苷酶	水解乳糖	1977
L-天冬氨酸 β -脱羧酶	生产L-丙氨酸	1982

各种固定化酶方法的优缺点比较

特性	物理吸附法	离子结合法	包埋法	共价结合法	交联法
制备	易	易	易	难	难
结合力	中	弱	强	强	强
酶活力	高	高	高	中	中
底物专一性	无变化	无变化	无变化	有变化	有变化
再生	可能	可能	不可能	不可能	不可能
固定化费用	低	低	中	中	高

没有一个方法是十全十美的，几种方法各有利弊

- **包埋、共价结合、共价交联**三种虽结合力强、但不能再生、回收；
- **吸附法**制备简单，成本低，能回收再生，但结合差，在受到离子强度、pH变化影响后，酶会从载体上游离下来。在使用价格较高的酶与载体时可行；
- **包埋法**各方面较好，但不适于大分子底物和产物。

5、固定化酶的性质

固定化是一种化学修饰，酶本身的结构必然受到扰动，同时酶固定化后，其催化作用由均相移到异相，由此带来的扩散限制效应、空间障碍、载体性质造成的分配效应等因素必然对酶的性质产生影响。

固定化酶活力

与其溶液酶相比，大多数固定化酶活性**下降**。

原因：

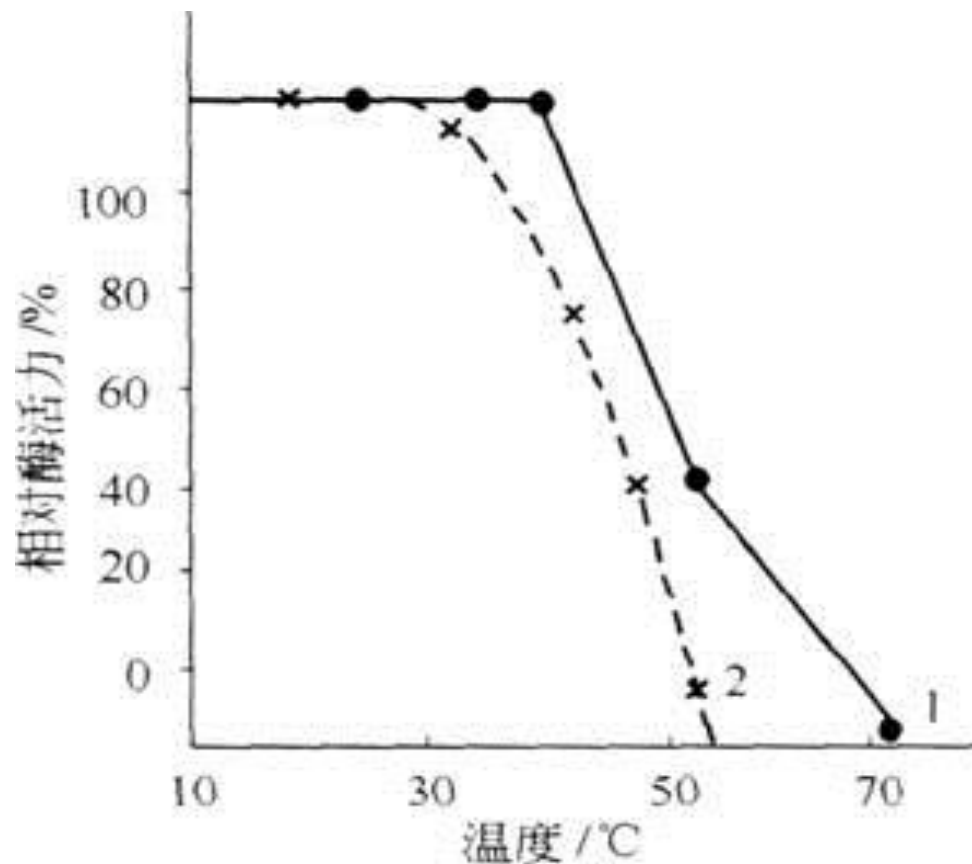
- 酶与不溶性载体相结合引起结构发生了变化。
- 固定化后，酶分子空间自由度受限制（空间位阻），直接影响到活性中心对底物的定位作用。
- 内扩散阻力使底物分子与活性中心的接近受阻。
- 包埋时酶被高分子物质半透膜包围，大分子底物不能透过膜与酶接近。

固定化酶的稳定性提高

原因：

- 固定化增加了酶构象的牢固程度。
- 挡住了不利因素对酶的侵袭。
- 限制了酶分子间的相互作用。
- 如果固定化触及到酶活性敏感区域，也可能导致酶稳定性下降。

固定化酶的稳定性



- 酶的耐热性 ↑
- 酶对变性剂, 抑制剂的抵抗能力 ↑
- 蛋白酶的破坏作用 ↑
- 酶的操作和保存有效期 ↑
- 尚未找到固定化方法与稳定性之间的规律性

巨大芽胞杆菌青霉素酰化酶连接到聚丙烯腈纤维载体上，制成固定化青霉素酰化酶。

最适温度的变化

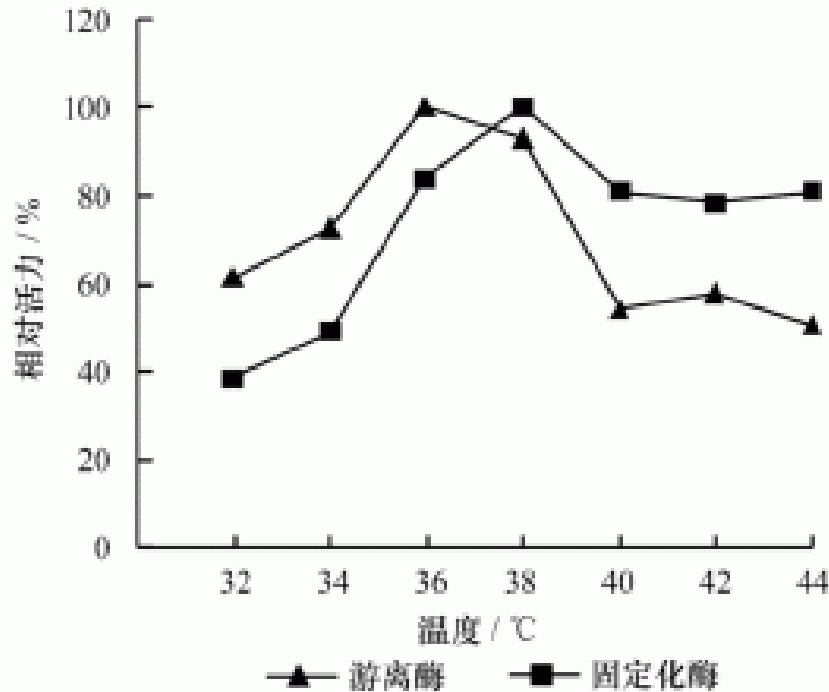


图1 最适反应温度比较

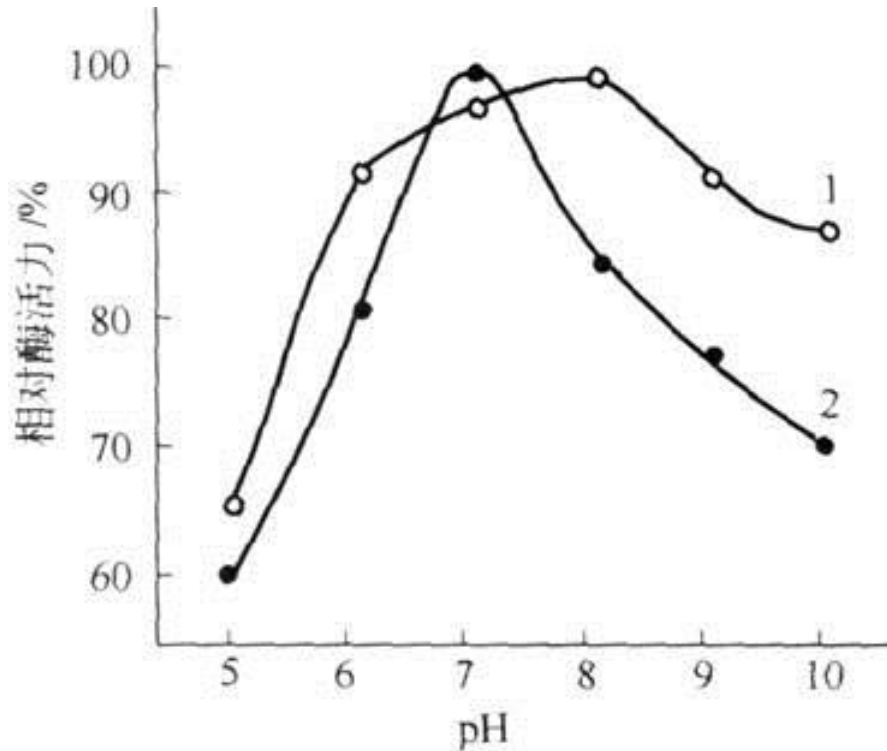
Fig. 1 Comparison of most suitable reaction temperature

➤ 酶反应的最适温度是酶热稳定性与反应速度的综合结果。

➤ 由于固定化后，酶的热稳定性提高，所以最适温度也随之提高，这是非常有利的结果。

➤ 当然，也有报道最适温度不变或下降的。

最适pH的变化



➤ 酶由蛋白质组成，其催化能力对外部环境特别是pH非常敏感。

➤ 酶固定化后，对底物作用的最适pH和pH-活性曲线常常发生偏移。

原因：微环境表面电荷性质的影响

pH对固定化前后天冬酰胺酶活力的影响

1. 固定化酶； 2. 游离酶

6、影响固定化酶性能的因素

固定化酶制备物的性质取决于所用的酶及载体材料的性质。

- 酶：生物化学性质；动力学参数
- 载体：化学特征；机械性质
- 固定化酶：固定化方法；稳定性等

固定化酶的特征参数

成分	参数
酶	<p>生物化学性质 分子量, 辅基, 蛋白质表面的功能基团, 纯度 (杂质的失活或保护作用)</p> <p>动力学参数 专一性, pH及温度曲线, 活性及抑制性的动力学参数, 对pH, 温度, 溶剂, 去污剂及杂质的稳定性。</p>
载体	<p>化学特征 化学组成, 功能基, 膨胀行为, 基质的可及体积, 微孔大小及载体的化学稳定性</p> <p>机械性质 颗粒直径, 单颗粒压缩行为, 流动抗性 (固定床反应器), 沉降速率 (流体床), 对搅拌罐的磨损。</p>
固定化酶	<p>固定化方法 所结合的蛋白, 活性酶的产量, 内在的动力学参数 (即无质量转移效应的性质)</p> <p>质量转移效应 分配效应 (催化剂颗粒内外不同的溶质浓度), 外部或内部 (微孔) 扩散效应; 这些给出了游离酶在合适反应条件下的效率。</p> <p>稳定性 操作稳定性 (表示为工作条件下的活性降低), 贮藏稳定性</p> <p>效能 生产力 (产品量/单位活性或酶量), 酶的消耗 (酶单位数/公斤产品)</p>

第八章 固定化酶及固定化细胞

第一节 酶的固定化

第二节 辅酶的固定化

第三节 细胞的固定化

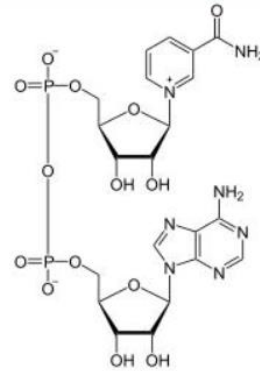
第四节 原生质体的固定化

二、辅酶的固定化

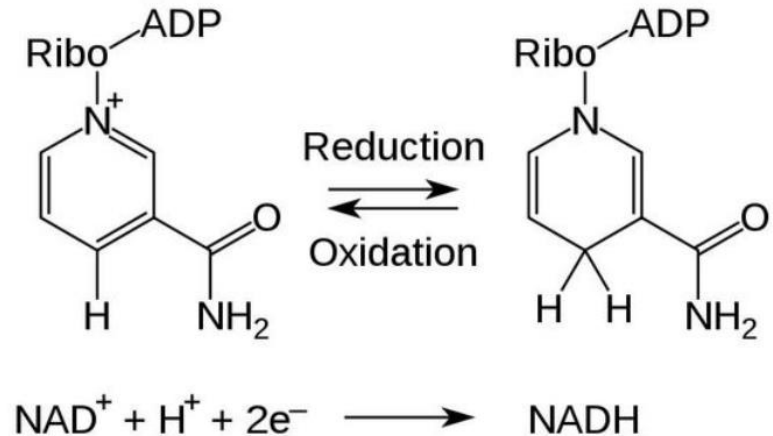
- 什么是辅酶（coenzyme）：一类可以将化学基团从一个酶转移到另一个酶上的有机小分子，与酶较为松散地结合，对于特定酶的活性发挥是必要的。
- 不同的辅酶能够携带的化学基团也不同：NAD或NADP+携带氢离子，辅酶A携带乙酰基，叶酸携带甲酰基，S-腺苷基蛋氨酸也可携带甲酰基。
- 有许多维他命及其衍生物，如核黄素、硫胺素和叶酸，都属于辅酶。这些化合物无法由人体合成，必须通过饮食补充。

辅酶I和辅酶II

- 在三十年代，辅酶I（NAD⁺, NADH）和辅酶II（NADP⁺, NADPH）就已经被分离出来，并分析了它的结构。
- 尼克酸是哺乳动物饮食所必需的营养物，它是辅酶I和辅酶II的前体。



NAD⁺和NADH的转化:



辅酶的特性

- 与酶蛋白结合疏松，用透析法容易与蛋白部分分开的有机小分子。
- 由于辅酶在酶催化反应中其化学组分发生了变化，因此可以认为辅酶是一种特殊的底物或者称为“第二底物”。这种所谓的第二底物可以被许多酶所利用。例如，目前已知有约七百种酶可以利用辅酶NADH进行催化。
- 在细胞内，反应后的辅酶可以被再生，以维持其胞内浓度在一个稳定的水平上。例如，NADPH可以通过磷酸戊糖途径和甲硫氨酸腺苷基转移酶作用下的S-腺苷基蛋氨酸来再生。

为什么要固定化辅酶？

有机辅因子中具有某些特殊的化学基团，参与酶的催化反应(递氢、递电子或递某些化学基团的作用)

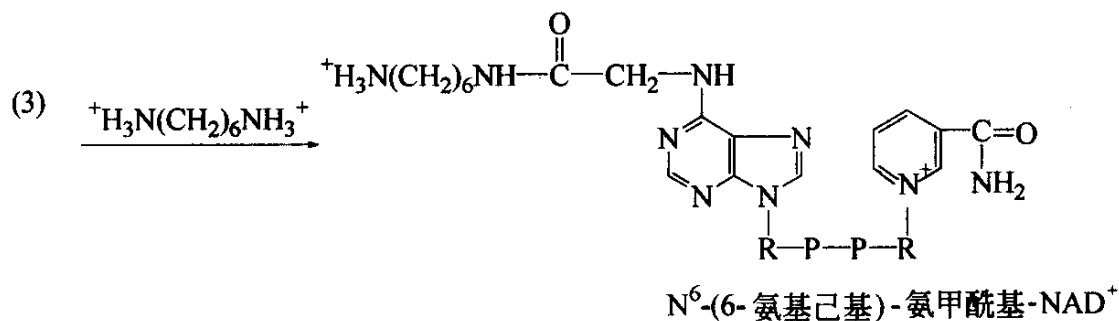
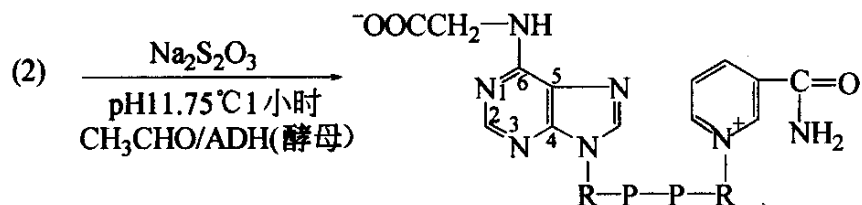
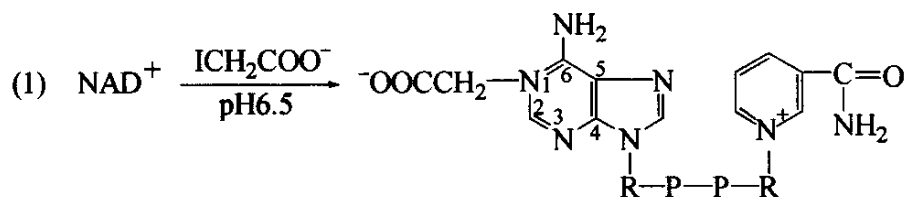
- 有机辅因子在使用过程中要流失，并且不能自行再生
- 有机辅因子价格昂贵

——工业上应用全酶的关键是有机辅因子的保留和再生

辅酶固定化的方法

- 固定化方法与酶相似，一般采用溴化氰法，碳二亚胺法以及重氮偶联法等共价偶联。
- 辅酶固定化必须解决辅酶在多个酶之间传递的障碍。
- 策略：先在辅酶的一定部位进行修饰—引入功能团和间隔臂（形成辅酶衍生物）—再与水溶性高分子结合

辅酶的固定化



①用碘乙酸使 NAD^+/NADH 腺嘌呤中的1位氮原子烷基化；

②在碱性条件下分子发生重排得到6位碳上的氨基酸被修饰的衍生物 $\text{N}^6\text{-羧甲基NAD}^+$ ；

③通过碳二亚胺法使长链接臂分子1, 6-己二胺与 NAD^+ 衍生物的羧基偶联；

➤辅酶 I 的化学组成是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD)，辅酶 II 的化学组成为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP)。

辅酶的固定化

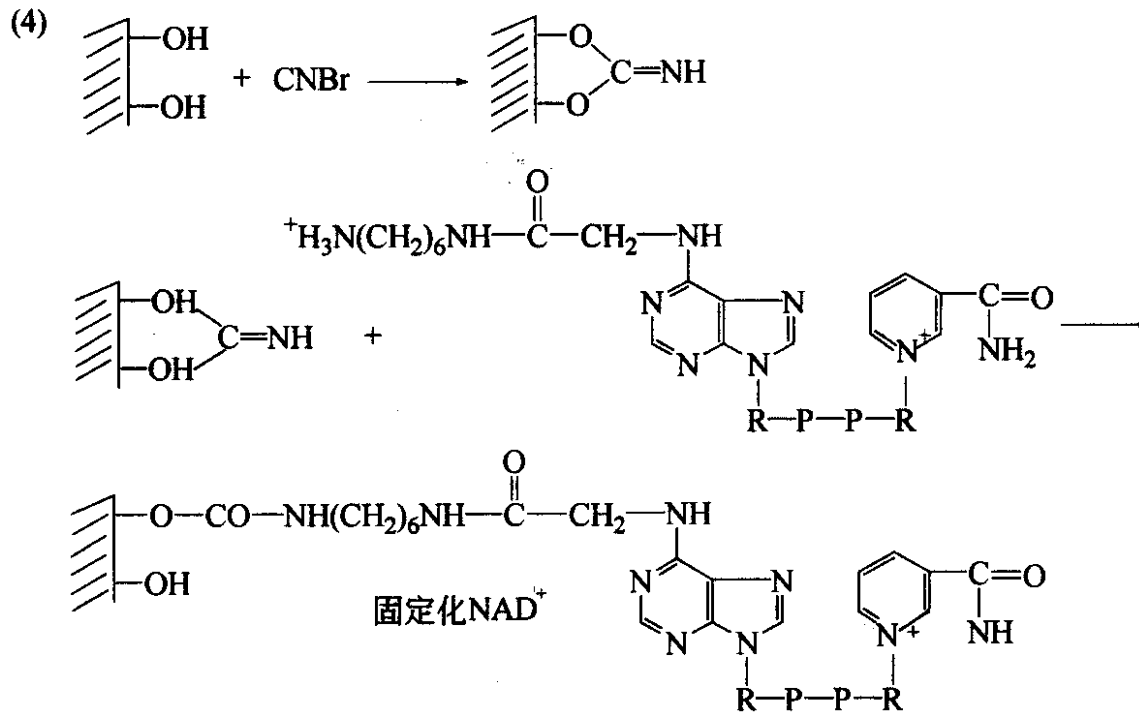


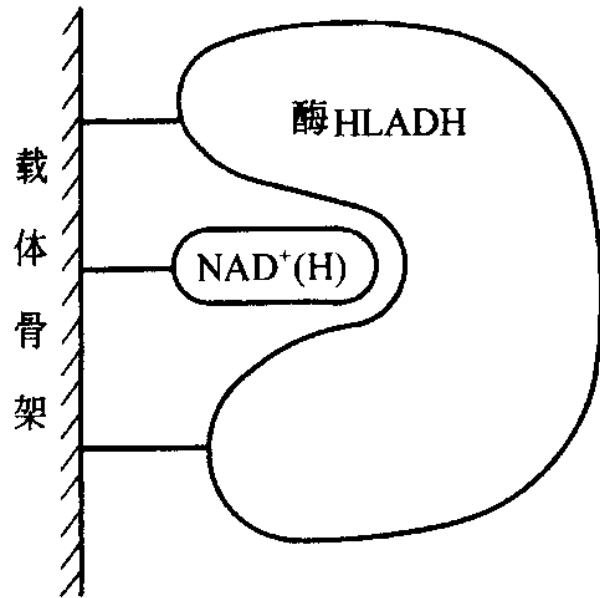
图 2-6 辅酶 NAD⁺ 在琼脂糖上的固定化

④长臂上另一端的氨基再与经过溴化氰活化了的琼脂糖偶联，从而得到了固定化辅酶。

辅酶再生

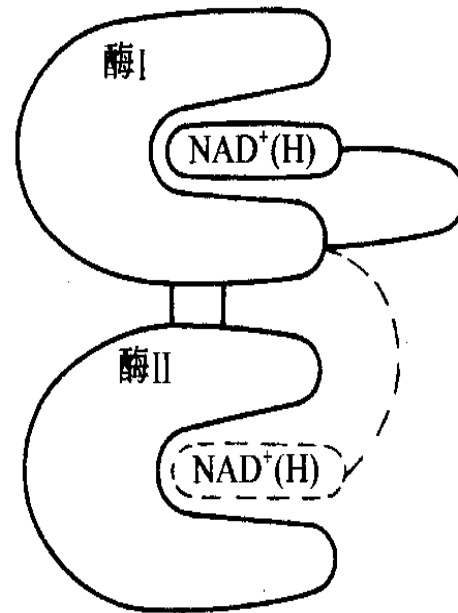
1. 一是使用含有酶的微生物细胞，通过提供适当的辅酶再生的底物，如葡萄糖，利用细胞的辅酶再生系统，使辅酶再生循环使用；
2. 另一种办法是建立辅酶再生的酶反应系统与主要的酶反应耦联，使辅酶可以再生循环使用。

辅酶再生的形式



(a)

辅酶和酶共固定



(b)

与酶分子偶联成辅酶-酶复合物

- 在酶催化反应时，需在反应系统中添加相关的辅助因子。而这些辅酶参加反应后，如果没有辅酶再生系统使之再生，一旦辅酶完全被消耗，酶反应就会停止。

第八章 固定化酶及固定化细胞

第一节 酶的固定化

第二节 辅酶的固定化

第三节 细胞的固定化

第四节 原生质体的固定化

三、细胞的固定化

➤ 将细胞约束或限制在一定的空间界限内，但细胞仍保留催化活性并具有能被反复或连续使用的活力。

➤ **优点：**

- ① 保持了细胞内酶系的原始状态与天然环境，因而更稳定保持了细胞内原有的多酶系统，适于多步催化的反应；
- ② 无需辅酶再生；
- ③ 固定化增殖细胞发酵具有显著优越性。

固定化细胞的缺点：

- ① 细胞内有多种酶，可能有副反应；
- ② 细胞膜等存在扩散限制作用；
- ③ 载体形成的孔隙大小影响高分子底物的通透性。

固定化细胞的分类

分类方式	固定化细胞
细胞类型	微生物，植物，动物
生理状态	死细胞：完整细胞，细胞碎片，细胞器 活细胞：增殖细胞，静止细胞，饥饿细胞

概念

- 固定在载体上并在一定的空间范围内进行生命活动的细胞称为**固定化细胞**。
- 该细胞能进行正常的生长、繁殖和新陈代谢，又称**固定化活细胞**或**固定化增殖细胞**。
- 在发酵工业中最有发展前途。

固定化细胞形态特征

- 固定化细胞由于其用途和制备方法的不同，可以是**颗粒状、块状、条状、薄膜状或不规则状**（与吸附物形状相同）等，目前大多数制备成颗粒状珠体。
- 细胞被固定在载体内在形态学上一般**没有明显的变化**。通过光学显微镜、电子显微镜观测表明细胞的形态与自然细胞没有明显差别。

固定化细胞生理状态

- **固定化死细胞：**在固定化之前或之后细胞经过物理或化学方法的处理以增加细胞膜的渗透性或抑制副反应，比较适于单酶催化的反应。
- **固定化静止细胞和饥饿细胞：**在固定化之后细胞是活的，但是由于采用了控制措施，细胞并不生长繁殖，而是处于休眠状态或饥饿状态。
- **固定化生长细胞：**又称固定化增殖细胞，是将活细胞固定在载体上并使其在连续反应过程中保持旺盛的生长、繁殖能力的一种固定化方法。

固定化增殖细胞的特点

- 细胞能够不断繁殖、更新，反应所需的酶也就可以不断更新。
- 反应酶处于天然的环境中，更加稳定。
- 从理论上讲，只要载体不解体，不污染，就可以长期使用。
- 更适合于进行多酶顺序连续反应。

细胞固定化方法

其制备方法和应用与固定化酶基本相同

1. 化学法（共价交联）
2. 包埋法
3. 吸附法

1、吸附法

它主要通过载体与细胞间的静电引力，即细胞表面与载体之间范德华作用力，离子键和氢键作用力，才使细胞固定在载体上的。

影响吸附法的主要因素

- 细胞的性质和细胞壁的组成：细胞壁的电荷性质
- 载体的性质：特别是玻璃、陶瓷等无机材料

2、包埋固定法

包埋法是在细胞自身并不与凝胶基体发生化学键合的情况下将其包埋在半透性聚合物颗粒（或膜）内的一种固定化方法。包埋法的最大优点是能较好的保持细胞内多酶系统的活力，可象游离细胞那样进行产物的发酵生产。

- 常用载体：琼脂、海藻酸钙、角叉菜胶、明胶、聚丙烯酰胺
- 常用凝胶包埋法

固定化细胞的性质

- **细胞浓度提高：**在固定化体系中，细胞生长得更快，直到达到一个稳定状态
- **克隆基因产物的高效表达**
- **质粒的遗传稳定性提高**
- **培养条件对质粒稳定性、菌体量及克隆基因产物的影响**

评价固定化酶（细胞）的指标

固定化酶（细胞）的活力：是指固定化酶（细胞）的催化某一特定化学反应的能力，其大小可用在一定条件下它所催化的某一反应的反应初速度来表示。

- **固定化酶（细胞）的活力单位**可定义为每毫克干重固定化酶（细胞）每分钟转化底物（或生产产物）的量，表示为 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ 。如是酶膜、酶管、酶板，则以单位面积的反应初速度 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{cm}^2$ 来表示。
- **要注明测定条件：**温度、搅拌速度、固定化酶的干燥条件、固定化的原酶含量或蛋白质含量及用于固定化酶的原酶的比活性等。

偶联率及相对活力的测定

- 偶联率 = $(\text{加入蛋白质活力} - \text{上清蛋白质活力}) / \text{加入蛋白质活力} \times 100\%$
- 活力回收 = $\text{固定化酶总活力} / \text{加入酶的总活力} \times 100\%$
- 相对活力 = $\text{固定化酶总活力} / (\text{加入酶的总活力} - \text{上清液中未偶联酶活力}) \times 100\%$
- 固定化酶（细胞）的半衰期，指在连续测定条件下，固定化酶（细胞）的活力下降为最初活力一半所经历连续的工作时间，以 $t_{1/2}$ 表示。

第八章 固定化酶及固定化细胞

第一节 酶的固定化

第二节 辅酶的固定化

第三节 细胞的固定化

第四节 原生质体的固定化

四、原生质体固定化

- 固定化细胞可以取代游离细胞进行发酵，但固定化细胞只能用于生产胞外酶和其它能够分泌到细胞外的产物。
- 细胞壁是细胞产生的代谢产物不能分泌到细胞外的原因之一。
- 微生物细胞和植物细胞除去细胞壁后，就可以获得原生质体。
- 将原生质体用多孔凝胶包埋起来，制成固定化原生质体。

原生质体固定化

- 收集对数生长期的细胞，悬浮在含有渗透稳定剂的高渗溶液中。
- 加入适宜的细胞壁水解酶，在一定条件下作用一段时间，使细胞壁破裂。
- 为防止原生质体破裂，应加入对原生质体无毒性，不影响细胞壁水解酶活力的渗透压稳定剂。
- 离心除去未被作用的细胞及细胞碎片，获得球状原生质体。
- 原生质体的固定化一般采用凝胶包埋法。

不同种类的细胞，由于各自细胞壁的组成，结构和性质不同，原生质体的制备方法也不一样。

- 细菌细胞壁主要成分是肽聚糖，采用蛋清中得到的溶菌酶。**
- 酵母细胞壁主要成分是葡聚糖，采用 β -1,3-葡聚糖酶。**
- 霉菌的细胞壁组分比较复杂，除几丁质外，还有其他多种成分，需几丁质酶与其它有关酶类共同作用。**
- 植物细胞细胞壁有纤维素，半纤维素和果胶等，采用纤维素酶和果胶酶。**

原生质体固定化的特点

- 细胞没有增殖能力，但保留胞内的新陈代谢活动。
- 增加细胞膜的通透性，有利于氧气和营养物质的传递，也有利于胞内物质的分泌，提高产量。
- 可反复连续使用较长的时间。
- 原生质体易于和发酵产物分开，有利于产物的分离纯化。
- 在固定化原生质体发酵的培养基中需要添加渗透压稳定剂，以保持原生质体的稳定性。

固定化原生质体的应用

- **氨基酸的生产：**karube等以琼脂糖-多空纤维素固定化黄色短杆菌原生质体，用于生产谷氨酸。固定化原生质体发酵生产谷氨酸产率为固定化细胞的2.6倍，可反复使用6批。
- **胞内酶的生产：**1986年，郭勇等用固定化枯草杆菌原生质体生产碱性磷酸酶，是原来存在于细胞间质中的碱性磷酸酶，全部分泌到发酵液中，提高产率的36%，可连续使用37天。