

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07C 69/38

C07C 67/22



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02157163.5

[43] 公开日 2004 年 7 月 28 日

[11] 公开号 CN 1515538A

[22] 申请日 1998.2.20 [21] 申请号 02157163.5
分案原申请号 98803574.X

[30] 优先权

[32] 1997. 2. 20 [33] JP [31] 36508/1997

[32] 1997. 2. 20 [33] JP [31] 36510/1997

[71] 申请人 三菱丽阳株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 尾崎英司 榎本兼彦 远藤隆一

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 郭建新

权利要求书 1 页 说明书 11 页

[54] 发明名称 制备丙二酸衍生物的方法

[57] 摘要

一种生产由如下通式(II)表示的丙二酸单酯的方法： $\text{HOOCCH}_2\text{COOR}$ ，其中 R 表示烯基、芳基、芳烷基或 C_{1-20} 烷基，其特征在于，通过水解由如下通式(I)表示的氰基乙酸酯： NCCH_2COOR ，其中 R 同上述定义，该水解是通过应用微生物的培养物或任选该微生物经处理的细胞进行处理，所述微生物属于棒杆菌属、戈登氏菌属或红球菌属并具有腈水解酶活性。

ISSN 1008-4274

1.一种制备由式(II)表示的丙二酸单酯的方法:



其中R是烯基、芳基、未取代的芳烷基或C₁₋₂₀烷基,

该方法包括处理由式(I)表示的氰基乙酸酯:



其中R同式(II)中的定义,

所述处理是应用具有腈水解酶活性从而水解所述氰基乙酸酯的土生戈登氏菌 FERM BP - 4535 的培养物、细胞或得自其处理过的细胞的产物进行的。

2.权利要求1的方法,其中所述氰基乙酸酯被连续添加到反应溶液中,同时保持水解期间所述溶液中的所述氰基乙酸酯浓度在0.01~10wt%的范围内。

3.权利要求1的方法,其中R表示的未取代的芳烷基是苄基。

4.一种制备由式(II')表示的丙二酸单酯的方法:



其中R'是烯基、芳基、未取代的芳烷基或C₃₋₂₀烷基,

该方法包括处理由式(I')表示的氰基乙酸酯:



其中R'同式(II')中的定义,

所述的处理是应用具有腈水解酶活性从而水解所述氰基乙酸酯的土生戈登氏菌 FERM BP - 4535 的培养物、细胞或得自其处理过的细胞的产物进行的。

5.权利要求4的方法,其中R'表示的未取代的芳烷基是苄基。

制备丙二酸衍生物的方法

本发明涉及一种制备丙二酸单酯的方法，所述丙二酸单酯适用作各种化学制品、药物、农药等的合成中的中间体。

常用的一种制备丙二酸单酯的方法是丙二酸二酯的化学水解。然而，按该方法，难于将生成的丙二酸单酯与未反应的丙二酸二酯和副产物丙二酸分离。于是，不可能获得高纯度的丙二酸单酯。

作为获得高纯度的丙二酸单酯的一种方法，已知一种方法应用 Meldrum's 酸作原料〔例如参见，Matoba Katsuhide 等，化学药物通报 (Chem. Pharm. Bull.), 31(8), 2955(1983); 或 Rigo B.等，四面体通讯 (Tetrahedron Lett.), 30(23), 3073(1989)〕。但是，由于该方法应用了昂贵的 Meldrum's 酸，所以不能说它是一种实际的方法，它不适合工业生产。

作为获得高纯度的丙二酸单酯的另一种方法，已知这样一种方法：其中应用能水解酯键的酶或微生物处理丙二酸二酯（日本未审查的专利公开 No. 8-173174）。但是，从成本考虑，应用丙二酸二酯作原料是不利的。

因此，需要开发制备高纯度丙二酸单酯的高产量方法。

本发明的目的是提供一种制备丙二酸单酯的高产量方法，其中所述的丙二酸单酯适用作各种化学制品、药物、农药等的合成中的中间体。

本发明人发现了，当应用具有腈水解酶活性的微生物的培养物、细胞或得自该微生物的处理过的细胞的产物处理氰基乙酸酯时，选择性地生产了丙二酸单酯；按该方法，可制备高纯度的丙二酸单酯而没有副反应（例如酯键的水解）。从而完成了本发明。

本发明包括如下发明：

(1) 一种制备由式 (II) 表示的丙二酸单酯的方法：



其中 R 是烯基、芳基、芳烷基或 C₁₋₂₀ 烷基，
该方法包括处理由式 (I) 表示的氰基乙酸酯：



其中 R 同式 (II) 中的定义，
所述处理是应用微生物的培养物、细胞或得自微生物的处理过的细胞的产物进行的，所述微生物属于棒杆菌属(*Corynebacterium*)、戈登氏菌属(*Gordona*)或红球菌属(*Rhodococcus*)并具有腈水解酶活性从而水解所述氰基乙酸酯。

(2) 前述 (1) 的方法，其中所述氰基乙酸酯被连续添加到反应溶液中，同时保持水解期间该溶液中的氰基乙酸酯浓度在 0.01 ~ 10wt% 的范围内。

(3) 前述 (1) 的方法，其中 R 表示的 C₁₋₂₀ 烷基是 C₃₋₂₀ 烷基，并且具有腈水解酶活性的微生物是属于红球菌属的微生物。

(4) 前述 (3) 的方法，其中所述氰基乙酸酯被连续添加到反应溶液中，同时保持水解期间所述溶液中的氰基乙酸酯浓度在 0.01 ~ 10wt% 的范围内。

(5) 前述 (1) 的方法，其中具有腈水解酶活性的微生物是 *Corynebacterium nitrilophilus* ATCC 21419。

(6) 前述 (1) 的方法，其中具有腈水解酶活性的微生物是土生戈登氏菌(*Gordona terrae*)MA-1(FERM BP-4535)。

(7) 前述 (1) 的方法，其中具有腈水解酶活性的微生物是紫红红球菌(*Rhodococcus rhodochrous*)ATCC 33025。

(8) 一种制备由式 (II') 表示的丙二酸单酯的方法：



其中 R' 是烯基、芳基、芳烷基或 C₃₋₂₀ 烷基，
该方法包括处理由式 (I') 表示的氰基乙酸酯：



其中 R' 同式 (II') 中的定义，
所述处理是应用具有腈水解酶活性从而水解所述氰基乙酸酯的微生物的培养物、细胞或得自该微生物的处理过的细胞的产物进行的。

(9) 前述(8)的方法, 其中所述氰基乙酸酯被连续添加到反应溶液中, 同时保持水解期间所述溶液中的氰基乙酸酯浓度在 0.01~10wt% 的范围内。

下文将详细描述本发明。

式(I)或(II)中 R 表示的烷基可以具有直链结构或支链结构。该烷基中的碳原子数是 1~20, 优选是 1~10, 更优选是 2~6。该烷基的具体实例包括: 甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、异丁基、正戊基、异戊基、己基、庚基、辛基、2-乙基己基、癸基、十二烷基、十四烷基、十六烷基、十八烷基和二十烷基。

式(I')或(II')中 R' 表示的烷基可以具有直链结构或支链结构。该烷基中的碳原子数是 3~20, 优选是 3~10, 更优选是 3~6。该烷基的具体实例包括正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、异丁基、正戊基、异戊基、己基、庚基、辛基、2-乙基己基、癸基、十二烷基、十四烷基、十六烷基、十八烷基和二十烷基。

R 表示的烯基可以具有直链结构或支链结构。该烯基中的碳原子数是 2~20, 优选是 2~6。该烯基的具体实例包括乙烯基、烯丙基、巴豆基(2-丁烯基)和异丙烯基(1-甲基乙烯基)。

R' 表示的烯基可以具有直链结构或支链结构。该烯基中的碳原子数是 3~20, 优选是 3~6。该烯基的具体实例包括烯丙基、巴豆基(2-丁烯基)和异丙烯基(1-甲基乙烯基)。

至于 R 或 R' 表示的芳基, 可以列举的有: 芳烃基, 例如苯基、1-萘基、2-萘基; 芳杂环基, 例如咪唑基、噻吩基、吡咯基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、咪唑基、吡唑基、吡啶基、嘧啶基、哒嗪基、吡嗪基、喹啉基、异喹啉基; 等等。

至于 R 或 R' 表示的芳烷基, 可以列举的有: 苄基、1-萘基甲基、2-萘基甲基、苯乙基(2-苯基乙基)、1-苯基乙基、苯丙基、苯丁基、苯戊基、苯己基、甲苄基、甲基苯乙基、二甲基苄基、二甲基苯乙基、三甲基苄基、乙基苄基、二乙基苄基等。

在由式(I)表示的氰基乙酸酯中, 代表性的化合物例如有: 氰基乙酸甲酯、氰基乙酸乙酯、氰基乙酸正丙酯、氰基乙酸异丙酯、氰基乙

酸正丁酯、氰基乙酸叔丁酯、氰基乙酸 2-乙基己酯、氰基乙酸烯丙酯和氰基乙酸苄酯。

在由式 (I') 表示的氰基乙酸酯中，代表性的化合物例如有：氰基乙酸正丙酯、氰基乙酸异丙酯、氰基乙酸正丁酯、氰基乙酸叔丁酯、氰基乙酸 2-乙基己酯、氰基乙酸烯丙酯和氰基乙酸苄酯。

对应用于本发明中的微生物没有特别限制，只要它属于棒杆菌属、戈登氏菌属或红球菌属并且具有腈水解酶活性即可。该微生物的具体实例包括 *Corynebacterium nitrilophilus* ATCC 21419、土生戈登氏菌 MA-1 (FERM BP-4535) 和紫红红球菌 ATCC 33025。

在这些微生物中，土生戈登氏菌 MA-1 已被保藏在国立生命科学和人体技术研究所，工业科学和技术处，1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 日本，以前述登记号保藏。*Corynebacterium nitrilophilus* 和紫红红球菌都可得自保藏所，例如美国典型培养物保藏中心 (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, 美国。

当式 (I) 表示的氰基乙酸酯 (其中 R 是烯基、芳基、芳烷基或 C₃₋₂₀ 烷基) [即式 (I') 表示的氰基乙酸酯] 被用作底物时，对应用的微生物没有特别限制，只要它具有腈水解酶活性即可。除了前述微生物外，本发明中也可应用例如属于如下属并具有腈水解酶活性的微生物：假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、短杆菌属 (*Brevibacterium*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、埃希氏菌属 (*Escherichia*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、气单胞菌属 (*Aeromonas*)、枝动菌属 (*Mycoplana*)、纤维单胞菌属 (*Cellulomonas*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*) 或念珠菌属 (*Candida*)。

更具体地，可列举：类黄假单胞菌 (*Pseudomonas synxanta*) IAM 12356、乙酰短杆菌 (*Brevibacterium acetylicum*) IAM 1790、星状诺卡氏菌 (*Nocardia asteroides*) IFO 3384、氧化节杆菌 (*Arthrobacter oxydans*) IFO 12138、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) ATCC 21697、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) IFO 3301、藤黄微球菌 (*Micrococcus*

luteus)ATCC 383、灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)IFO 3355、斑点气单胞菌(*Aeromonas punctata*)IFO 13288、两形枝动菌(*Mycoplana dimorpha*)ATCC 4297、粪肥纤维单胞菌(*Cellulomonas fimi*)IAM 12107、草生欧文氏菌(*Erwinia herbicola*)IFO 12686 或吉利蒙氏念珠菌(*Candida guilliermondii*)IFO 0566。这些微生物中,具有 ATCC 号的微生物可得自美国典型培养物保藏中心, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, 美国; 具有 IAM 号的那些可得自 IAM 培养物保藏中心, 细胞和分子研究中心, 分子和细胞生物科学研究所, 东京大学, 1-1, Yayoi 1-chome, Bunkyo-ku, Tokyo, 日本; 具有 IFO 号的那些可得自发酵研究所, Osaka, 17-85, Jusohonmachi 2-chome, yodogawa-ku, Osaka-shi, Osaka, 日本。

所述微生物可在液体培养基或固体培养基中培养。应用的培养基适当地含通常可被微生物同化的碳源和氮源、维生素、矿物质等。还可往所述培养基中加入少量腈或内酰胺化合物以便改善所述微生物的水解能力。该腈化合物是 C_{1-12} 直链或支链脂族腈或芳族腈。例如可列举: 丙腈、异戊腈、己腈、丙烯腈、己二腈、苜腈、2-吡啶腈等。作为内酰胺化合物, 例如可列举: γ -丁内酰胺、 δ -戊内酰胺或 ϵ -己内酰胺。是在微生物能生长的一定的温度和一定的 pH 值下进行培养。优选地, 是在应用的微生物菌株的最适培养条件下进行培养。为了促进微生物的生长, 可采取通气搅拌。

在本发明中, 无需任何处理即可应用通过在培养基中培养前述具有腈水解酶活性的微生物而获得的培养物。也可应用通过离心或其它操作从培养物收获的微生物的细胞。此外, 还可应用得自处理过的微生物细胞的产物。得自处理过的细胞的产物具体实例包括用丙酮、甲苯等处理过的细胞; 破裂的细胞; 得自破裂的细胞的无细胞提取物; 以及从细胞中分离的粗酶或纯化酶。可以在反应之后再循环这些细胞或产物, 方法是在将这些细胞或产物截留/固定于交联丙烯酰胺凝胶等或者通过物理或化学方法将它们固定于固体载体(例如离子交换树脂、硅藻土等)之后再应用这些细胞或产物。

在本发明中, 优选地可通过如下操作制备丙二酸单酯。简单地说,

将氰基乙酸酯（底物）加到反应介质中而溶解或悬浮该酯。在所述底物的添加之前或之后往该反应介质中加入将起催化剂作用的所述微生物的培养物等。然后进行水解反应，同时控制反应温度和（如果必要的话）该反应溶液的 pH。作为反应介质，例如可应用去离子水或缓冲液。反应温度通常是 0~70℃，优选是 10~35℃。可为该反应选择能增强所述微生物细胞等的腈水解酶活性的温度。反应溶液的 pH 取决于应用的微生物的酶的最适 pH。一般说来，优选在 pH6~9 下进行反应，因为在这样的 pH 值下可抑制由化学水解引起的副反应。反应溶液中，细胞或得自处理过的细胞的产物的浓度以干重表示通常是 0.01~5wt%。对反应溶液中的底物浓度没有特别限制，只要它在 0.01~70wt% 的范围内即可。优选地，所述底物浓度在 0.1~15wt% 的范围内。

此外，可以通过在水解反应期间连续添加所述氰基乙酸酯而高浓度地积累丙二酸单酯。此时，为了将底物对酶的钝化作用降至最小，以这种方式添加底物，即保持反应溶液中的底物浓度优选在 0.01~10wt%，更优选在 0.1~5wt%。

在反应完成后，通过离心、过滤等除去用作催化剂的所述微生物细胞。然后，可通过用溶剂（例如己烷、乙酸乙酯等）提取所得溶液回收未反应的氰基乙酸酯。在用酸（例如硫酸、盐酸等）将提取后的残余物的 pH 调节到 1~2 后，用溶剂（例如己烷、乙酸乙酯等）提取该残余物，于是得反应产物丙二酸单酯。

下文将参照如下实施例更具体地描述本发明。但是，本发明的范围不限于这些实施例。

实施例 1

将土生戈登氏菌 MA-1 (FERM BP-4535) 接种入 3ml 已灭菌的 LB 培养基（1% 聚脲、0.5% 酵母提取物、0.5% NaCl）并在振荡下在 30℃ 下培养 24 小时。将一毫升所得细胞培养液接种入 100ml 下列已灭菌的培养基 A 并在 30℃ 下培养 48 小时。

培养基 A (pH7.2)

甘油	1.0%
异戊腈	0.2%
酵母提取物	0.02%
KH ₂ PO ₄	0.2%
NaCl	0.1%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.02%
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10ppm
CoCl ₂ · 4H ₂ O	10ppm
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1ppm
MnCl ₂ · 4H ₂ O	7ppm

在完成培养后，将培养液离心分离。用去离子水洗涤全部体积的生成的细胞，然后悬浮于 100ml 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 中。该细胞悬浮液的浊度是 OD₆₃₀ = 5.5。往该细胞悬浮液中加入 1.00g 作为底物的氰基乙酸乙酯并在 30℃ 下反应 1 小时。通过高效液相色谱 (HPLC; 柱: TSK 凝胶 ODS-120A(Tosoh Corp.), 4.6mm I.D. × 25cm; 流动相: 5% 乙腈, 95% 水, 0.1% 磷酸; 流速: 0.5ml/min; 检测: UV220nm) 分析形成的反应溶液。结果发现, 全部底物已被转化成丙二酸单乙酯。在反应完成后, 通过离心除去细胞。然后, 往形成的溶液中添加 2N HCl 而调节 pH 至 2.0。随后用乙酸乙酯从该溶液中提取反应产物丙二酸单乙酯。往形成的有机层中添加无水硫酸钠进行脱水, 再通过蒸馏除去溶剂。结果得 1.05g 丙二酸单乙酯 (产率: 89.9%)。

实施例 2

按与实施例 1 中相同的方法获得丙二酸单乙酯 (1.07g, 产率: 91.6%), 不同的是应用 *Corynebacterium nitrilophilus* ATCC 21419 作所述微生物。

实施例 3

按与实施例 1 中相同的方法获得丙二酸单甲酯 (0.97g, 产率: 81.4%), 不同的是应用氰基乙酸甲酯作底物。

实施例 4

按与实施例 1 中相同的方法获得丙二酸单正丙酯(1.05g, 产率: 91.3 %) , 不同的是应用氰基乙酸正丙酯作底物。

实施例 5

按与实施例 1 中相同的方法获得丙二酸单异丙酯(1.02g, 产率: 88.7 %) , 不同的是应用氰基乙酸异丙酯作底物。

实施例 6

按与实施例 1 中相同的方法获得丙二酸单正丁酯(1.06g,产率: 93.4%) , 不同的是应用氰基乙酸正丁酯作底物。在 HPLC 分析中, 将 40% 乙腈、60% 水和 0.1% 磷酸用作流动相。

实施例 7

按与实施例 6 中相同的方法获得丙二酸单叔丁酯(1.05g,产率: 92.5%) , 不同的是应用氰基乙酸叔丁酯作底物。

实施例 8

按与实施例 6 中相同的方法获得丙二酸单烯丙酯(1.02g, 产率: 87.2%) , 不同的是应用氰基乙酸烯丙酯作底物。

实施例 9

按与实施例 6 中相同的方法获得丙二酸单 2-乙基己酯(1.01g, 产率: 91.8%) , 不同的是应用氰基乙酸 2-乙基己酯作底物。

实施例 10

按与实施例 6 中相同的方法进行反应, 不同的是应用氰基乙酸苄酯作底物。在酶反应完成后, 有 10% 氰基乙酸苄酯未反应。用乙酸乙酯提取未反应的氰基乙酸苄酯而将它脱除。提取后, 将 2N HCl 加入形成的水层而调节 pH 至 2.0。然后, 用乙酸乙酯提取该反应产物丙二酸单苄酯。将无水硫酸钠加到形成的有机层中进行脱水, 再通过蒸馏除去溶剂。结果获得 0.89g 丙二酸单苄酯(产率: 80.3%) 。

实施例 11~19

往按实施例 1 中相同方法制备的细胞悬浮液中添加氰基乙酸乙酯而给出 5~50wt% 的浓度并在 25℃ 下反应 20 小时。当反应完成后, 通过液相色谱法测定产率。结果示于表 1 中。

表 1

实施例	底物浓度 (wt%)	产率 (%)
11	5	100
12	10	100
13	15	84.1
14	20	59.6
15	25	48.3
16	30	37.3
17	35	29.7
18	40	25.3
19	50	19.6

实施例 20

往 100ml 按与实施例 1 中相同方法制备的细胞悬浮液中添加 5g 氰基乙酸乙酯并在 25℃ 下反应。然后, 进一步分批地往反应溶液中添加 30g 氰基乙酸乙酯, 同时测定该溶液中的底物浓度, 使它不超过 5wt%。30 小时后, 产率是 100%。

实施例 21

将紫红红球菌 ATCC 33025 接种入 3ml 已灭菌的 LB 培养基 (1% 聚脲、0.5% 酵母提取物、0.5% NaCl) 并在振荡下在 30℃ 下培养 24 小时。将一毫升所得细胞培养液接种入 100ml 下列已灭菌的培养基 A 并在 30℃ 下培养 48 小时。

培养基 A (pH7.2)

甘油	1.0%
异戊腈	0.2%
酵母提取物	0.02%
KH ₂ PO ₄	0.2%
NaCl	0.1%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.02%
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10ppm
CoCl ₂ · 4H ₂ O	10ppm

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1ppm

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7ppm

在完成培养后，将培养液离心分离。用去离子水洗涤全部体积的生成的细胞，然后悬浮于 100ml 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 中。该细胞悬浮液的浊度是 $\text{OD}_{630} = 5.6$ 。往该细胞悬浮液中加入 1.00g 作为底物的氰基乙酸正丙酯并在 30℃ 下反应 1 小时。通过高效液相色谱 (HPLC; 柱: TSK 凝胶 ODS-120A(Tosoh Corp.), 4.6mm I.D. × 25cm; 流动相: 5% 乙腈, 95% 水, 0.1% 磷酸; 流速: 0.5ml/min; 检测: UV220nm) 分析形成的反应溶液。结果发现, 全部底物已被转化成丙二酸单正丙酯。在反应完成后, 通过离心除去细胞。然后, 往形成的溶液中添加 2N HCl 而调节 pH 至 2.0。随后用乙酸乙酯从该溶液中提取反应产物丙二酸单正丙酯。往形成的有机层中添加无水硫酸钠进行脱水, 再通过蒸馏除去溶剂。结果得 1.06g 丙二酸单正丙酯 (产率: 89.9%)。

实施例 22

按与实施例 21 中相同的方法获得丙二酸单异丙酯 (1.01g, 产率: 88.6%), 不同的是应用氰基乙酸异丙酯作底物。

实施例 23

按与实施例 21 中相同的方法获得丙二酸单正丁酯 (1.05g, 产率: 93.3%), 不同的是应用氰基乙酸正丁酯作底物。在 HPLC 分析中, 将 40% 乙腈、60% 水和 0.1% 磷酸用作流动相。

实施例 24

按与实施例 23 中相同的方法获得丙二酸单叔丁酯 (1.04g, 产率: 92.4%), 不同的是应用氰基乙酸叔丁酯作底物。

实施例 25

按与实施例 23 中相同的方法获得丙二酸单烯丙酯 (1.04g, 产率: 87.1%), 不同的是应用氰基乙酸烯丙酯作底物。

实施例 26

按与实施例 23 中相同的方法获得丙二酸单 2-乙基己酯 (1.00g, 产率: 91.7%), 不同的是应用氰基乙酸 2-乙基己酯作底物。

实施例 27

按与实施例 23 中相同的方法进行反应，不同的是将氰基乙酸苄酯用作底物。在酶反应完成后，有 10% 氰基乙酸苄酯未反应。用乙酸乙酯提取未反应的氰基乙酸苄酯而将它脱除。提取后，将 2N HCl 加入形成的水层而调节 pH 至 2.0。然后，用乙酸乙酯提取该反应产物丙二酸单苄酯。将无水硫酸钠加到形成的有机层中进行脱水，再通过蒸馏除去溶剂。结果获得 0.88g 丙二酸单苄酯（产率：80.2%）。

实施例 28~36

往按实施例 21 中相同方法制备的细胞悬浮液中添加氰基乙酸正丙酯而给出 5~50wt% 的浓度并在 25℃ 下反应 20 小时。当反应完成后，通过液相色谱法测定产率。结果示于表 2 中。

表 2

实施例	底物浓度 (wt%)	产率 (%)
28	5	100
29	10	100
30	15	85.1
31	20	57.6
32	25	44.3
33	30	32.3
34	35	26.7
35	40	20.3
36	50	15.6

实施例 37

往 100ml 按与实施例 21 中相同方法制备的细胞悬浮液中添加 5g 氰基乙酸正丙酯并在 25℃ 下反应。然后，进一步分批地往反应溶液中添加 20g 氰基乙酸正丙酯，同时测定该溶液中的底物浓度，使它不超过 5wt%。30 小时后，产率是 100%。

按本发明，有可能以高生产率制备适用作各种化学制品、药物、农药等合成中的中间体的丙二酸单酯。