กลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์รองที่เกิดจากการผลิตไบโอดีเซลซึ่งในปัจจุบันมีกำลังการผลิตที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีกลีเซอรอลที่เหลือจากการผลิตไบโอดีเซลเพิ่มมากขึ้นและยังไม่ได้มีการนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นมากนัก ในวิถีการเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็น 3-Hydroxypropionaldehyde (3-HPA) ซึ่งคุณสมบัติเป็นสารต้านจุลชีพต่างๆ เช่น แบคทีเรียแกรมบวกและลบ ยีสต์ โปรโตซัว และเชื้อรา (anti-microbial substances) และ 1,3-Propanediol (1,3-PDO) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในพลาสติกที่ย่อยสลายได้ มีเอนไซม์ที่สำคัญสองชนิดคือ Glycerol dehydratase ซึ่งปลี่ยนกลีเซอรอลเป็น 3-HPA และ 1,3-Propanediol dehydrogenase ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยน 3-HPA เป็น 1,3-PDO งานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมและอณูชีววิทยาเพื่อโคลนยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ Glycerol dehydratase (*dhaBCE* genes) จาก *Lactobacillus reuteri* ซึ่งกลุ่มยีนดังกล่าวประกอบด้วย *dhaB* (Large subunit), *dhaC* (Medium subunit) และ *dhaE* (Small subunit) ผู้วิจัยได้สกัด Genomic DNA จาก *Lb. reuteri* เพื่อใช้เป็นแม่แบบ (Template) ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ (Specific primers) กับกลุ่มยีนดังกล่าว แบ่งการโคลนยีนออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 (*dhaB*), ส่วนที่ 2 (*dhaCE*) และ ส่วนที่ 3 (*dhaBCE*, ยีนเต็ม) ซึ่ง PCR products ที่ได้มีขนาดประมาณ 1.7 kb, 1.2 kb และ 2.9 kb ตามลำดับ จากนั้นได้เชื่อมต่อยีนแต่ละส่วนกับ pET101/D-TOPO® vector และส่งถ่าย (Transform) Recombinant plasmid เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 ด้วยวิธี Chemical Transformation ตามด้วย Heat shock ผู้วิจัยได้คัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่คาดว่าจะได้รับ Recombinant plasmid โดยการสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรียเพื่อนำมาใช้เป็น Template ในการทำ PCR และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนส่วนที่ 1, 2 และ 3 จากผลการทดลองพบโคโลนีที่ได้รับ Recombinant plasmid จึงได้ส่งโคลนไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) ขนาดของ PCR products ที่โคลนได้มีความสอดคล้องกับข้อมูลที่วิเคราะห์ได้จากระบบฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรมทางอณูชีววิทยา ซึ่งพบว่า *dhaB, dhaC* และ *dhaE* genes จาก *Lb. reuteri* มีความยาว 1,677, 711 และ 519 bp ซึ่งจะถูกแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 559, 237 และ 173 ตัว ตามลำดับ เมื่อใช้โปรแกรมของ Expasy Server เพื่อคำนวณหา Predicted molecular weight และ isoelectric point (pI) ของโปรตีนพบว่า Glycerol dehydratase large (dhaB), medium (dhaC) และ small (dhaE) subunits มีน้ำหนักโมเลกุล/pI เท่ากับ 62092/4.74, 25808/5.34 และ 19319/5.78 ตามลำดับ

A surplus of glycerol, which is the by-product from the production of biodiesel, is currently being generated, and has not been utilized in many ways. As a consequence, the study of bioconversion of glycerol to various compounds using microorganisms is of significant interest nowadays. In glycerol metabolism, glycerol is converted to form 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA), which is the anti-microbial substance, by glycerol dehydratase (dhaBCE). The product (3-HPA) is then reduced by 1,3-propanediol dehydrogenase (dhaT) to 1,3-propanediol (1,3-PDO), which can be used for the synthesis of various biodegradable polymers. This research employed the techniques in genetic engineering and molecular biology to clone *dhaBCE* genes encoding the three subunits (dhaB,large; dhaC, medium and dhaE, small) of glycerol dedydratase from *Lactobacillus reuteri*. Genomic DNA was extracted and used as a template in the Polymerase Chain Reaction (PCR) with gene specific primers. The cloned DNA fragments were divided into the following portions, 1) *dhaB*, 2) *dhaCE*, and 3) *dhaBCE* (full-length), with the PCR product sizes of 1.7 kb, 1.2 kb and 2.9 kb, respectively. Each DNA fragment was ligated to pET101/D-TOPO® vector, and the recombinant plasmids were transformed into *E. coli* strain TOP10 using chemical transformation followed by heat shock. The positive clones were verified by extracting the plasmids from the bacteria and performing PCR with the gene specific primers to check for specific PCR products of expected sizes. After the correct identification of the right clones, they were sent for sequencing. The sizes of the cloned PCR products were consistent with the data analyzed from the National Center for Biotechnology Information (NCBI). It was shown that *dhaB*, *dhaC* and *dhaE* genes were 1,677, 711 and 519 bp in length, and encoded a protein of 559, 237 and 173 amino acids, respectively. In addition, with the aid of the program from the Expasy Server, the theoretical molecular weight/isoelectric point (pI) of glycerol dehydratase large (dhaB), medium (dhaC) and small (dhaE) subunits were calculated to be 62092/4.74, 25808/5.34 and 19319/5.78, respectively.