

## **TELAAH PUSTAKA: PEMBUATAN BIOSURFAKTAN MENGUNAKAN MINYAK JELANTAH OLEH BAKTERI *BACILLUS SUBTILIS***

Rizky Kartika Septihanny dan Dwina Moentamaria  
Jurusan Teknik Kimia, Politeknik Negeri Malang, Jl. Soekarno Hatta No. 9, Malang, Indonesia  
[rizkykartika62@gmail.com](mailto:rizkykartika62@gmail.com), [[dwina\\_mnt@yahoo.com](mailto:dwina_mnt@yahoo.com)]

### **ABSTRAK**

Limbah minyak jelantah saat ini menjadi isu terbesar di Indonesia, dari hasil survey ditemukan bahwa sebanyak 1.889,506 ton minyak jelantah dibuang di selokan dan tanah setiap minggunya. Dari permasalahan tersebut, biosurfaktan dapat menjadi salah satu solusi untuk meremediasi minyak jelantah. Untuk produksi biosurfaktan dapat mengambil sumber karbon berupa minyak jelantah dengan bantuan bakteri *Bacillus subtilis*. Tujuan penelitian ini dilakukan adalah untuk mengetahui pengaruh pH dan suhu inkubasi pada produksi biosurfaktan. Penelitian ini dilakukan dengan cara membuat inoculum atau suspensi *Bacillus Subtilis* ditempatkan pada media cair NB (*Nutrient Broth*). Media pertumbuhan terdiri dari *Mineral Salt Medium* dengan substrat minyak jelantah. Produksi biosurfaktan diamati dengan mengukur tegangan permukaan menggunakan Tensiometer Du-Nouy, aktivitas emulsifikasi, uji enzim lipase dari krt yang didapat, dan produk kasar biosurfaktan. Suhu 37,5°C dan pH 4 dapat menurunkan tegangan permukaan hingga 20 N/m dan mendapatkan indeks emulsifikasi sebesar 69%. Penelitian yang dilakukan dengan suhu 27°C dapat menurunkan tegangan permukaan hingga 25 N/m dan mendapatkan indeks emulsifikasi sebesar 90%. Penelitian yang dilakukan dengan suhu 37°C dapat menurunkan tegangan permukaan hingga 23 N/m dan mendapatkan indeks emulsifikasi sebesar 62%. Dengan dilakukan penelitian ini diharapkan dapat mengurangi limbah minyak jelantah dan didapatkan surfaktan yang bersifat biodregedible dan ramah lingkungan.

**Kata kunci:** biosurfaktan, bacillus subtilis, minyak jelantah, tegangan permukaan

### **ABSTRACT**

Waste cooking oil is currently the biggest issue in Indonesia, from the survey results found that as many as 1,889,506 tons of used cooking oil are dumped in the gutters and soil every week. From these problems, biosurfactant can be one solution to remediate used cooking oil. For biosurfactant production, carbon sources can be used in the form of used cooking oil with the help of *Bacillus subtilis* bacteria. The purpose of this study was to determine the effect of pH and incubation temperature on biosurfactant production. This research was carried out by making an inoculum or *Bacillus Subtilis* suspension placed on liquid media NB (*Nutrient Broth*). The growth media consisted of *Mineral Salt Medium* with a ground oil substrate. Biosurfactant production was observed by measuring surface tension using a Du-Nouy Tensiometer, emulsification activity, lipase enzyme testing from the head of household obtained, and crude biosurfactant products. Temperature 37.5 ° C and pH 4 can reduce surface tension up to 20 N / m and get an emulsification index of 69%. Research conducted with a temperature of 27 ° C can reduce surface tension up to 25 N / m and get an emulsification index of 90%. Research conducted at 37 ° C can reduce surface tension to 23 N / m and get an emulsification index of 62%. By doing this research it is expected to reduce waste cooking oil waste and obtain surfactants that are biodregedible and environmentally friendly.

**Keywords:** bio-surfactant, bacillus subtilis, used cooking oil, surface tension

## 1. PENDAHULUAN

Biosurfaktan merupakan senyawa produk metabolit mikroba yang mengemulsi minyak di dalam air dan dapat mengurangi tegangan permukaan, sehingga dapat digunakan sebagai pengganti surfaktan untuk meningkatkan proses bioremediasi. Keunggulan biosurfaktan adalah sebagai emulsifier yang sifatnya lebih stabil dan sifatnya yang ramah lingkungan yaitu biodegradable. Biosurfaktan dapat diproduksi dari bahan organik yang melimpah seperti karbohidrat, lemak, dan protein.

Telah banyak penelitian yang dilakukan untuk mengetahui sumber karbon dan nitrogen yang terbaik untuk digunakan dalam produksi biosurfaktan. Misalnya dengan menggunakan glukosa, minyak zaitun, hexadkana, minyak sayuran, mineral oils, gliserol, minyak kedelai, gasolin, paraffin oil, whey dan molase sebagai sumber karbon dan menggunakan  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  urea,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$  dan  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sebagai sumber nitrogen.

Dari hasil survey yang dilakukan ditemukan bahwa sebanyak 1.889,506 ton minyak jelantah dibuang di selokan dan tanah di tiap minggunya. Dari seluruh responden yang bersedia untuk mengumpulkan minyak goreng bekas pakainya, sebanyak 98% menginginkan sistem pengumpulan minyak jelantah dengan cara disediakan suatu tempat khusus bagi mereka untuk menaruh minyak jelantah yang kemudian akan dijemput oleh petugas pengumpul minyak jelantah [1]. Minyak jelantah dapat dijadikan inducer lipase yang dibutuhkan untuk pembuatan biosurfaktan. Lipase merupakan enzim yang dapat larut dalam air dan secara alami mengkatalis hidrolisis ikatan ester dalam substrat lipid yang tidak larut air. Lipase adalah biokatalis yang berperan besar dalam aplikasi bioteknologi, seperti produksi obat, dan produksi flavor. Sama seperti sifat biosurfaktan yang dapat mengemulsi minyak didalam air. Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermafaat untuk mengolah minyak jelantah yang umumnya sering ditemukan sebagai bahan buangan atau limbah.

Dalam penelitian yang dilakukan [2] tentang skrining produksi biosurfaktan oleh mikroba potensial penghasil biosurfaktan salah satunya adalah *Bacillus subtilis* yang ditumbuhkan pada substrat minyak ini mempunyai kemampuan untuk menurunkan tegangan permukaan supernatant kultur antar 40,6 sampai 43 dyne/cm dan menurunkan respon yang memuaskan dalam aktivitas emulsifikasi kerosin yaitu 38,56 sampai 44,9% dalam waktu 24 jam.

Upaya yang dilakukan untuk mengoptimalkan produksi biosurfaktan adalah dengan memperhatikan faktor – faktor yang berpengaruh terhadap produksi biosurfaktam seperti jenis substrat pertumbuhan, jenis bakteri, sumber nutrisi, dan faktor lingkungan menjadi perhatian utama para peneliti dalam upaya optimasi produksi biosurfaktan tersebut. Produksi biosurfaktan *Bacillus Subtilis* berasosiasi dengan pertumbuhan, artinya apabila laju pertumbuhan tinggi maka laju produksi biosurfaktan akan meningkat. Pada media minyak jelantah, produksi biosurfaktan oleh *Bacillus Subtilis* menunjukkan peningkatan tajam sampai hari ke-3 waktu inkubasi dan selanjutnya tidak terjadi peningkatan produksi.

Hambatan produksi surfaktan dari mikroorganisme adalah prosesnya lambat, biaya pemurnian tinggi dan harga produk mahal. Biosurfaktan dari bahan alam mendapat perhatian dari kalangan peneliti dan industri untuk diproduksi skala industri karena prosesnya cepat, bahan baku tersedia melimpah dan murah.

## 2. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode studi literatur. Studi literatur dilakukan oleh penulis untuk mendapatkan data dari berbagai sumber tertulis, baik berupa jurnal, artikel, buku-buku, arsip, majalah, atau dokumen. Data yang diperoleh dikompilasi, dianalisis, dan disimpulkan sehingga mendapatkan kesimpulan.

### 2.1 Pretreatment Minyak Jelantah

Sebelum digunakan sebagai media kultivasi, minyak jelantah diberi perlakuan awal. Treatment yang dilakukan hanya menyaring minyak jelantah dari kotoran – kotoran bekas penggorengan. Setelah disaring, minyak jelantah disterilisasi dalam autoclave dengan suhu 121°C dan waktu 30 menit.

### 2.2 Pembuatan Media

#### a. Media padat

Media nutrient agar dibuat dengan melarutkan 2 g NA dengan 100 ml akuades. Media dididihkan di atas hot plate dan dihomogenkan dengan magnetic stirrer. Setelah mendidih, larutan disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 30 menit (Yudoyono, dkk., 2016). Penyiapan biakan murni *Bacillus Subtilis* dilakukan dengan menginokulasikan kultur murni *Bacillus Subtilis* pada permukaan media agar miring NA dengan metode gores, kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam.

#### b. Media cair

Media nutrient broth dibuat dengan melarutkan 13 g NB dengan 1000ml akuades. Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer 1000 ml, kemudian dididihkan di atas hot plate dan dihomogenkan dengan magnetic stirrer. Setelah mendidih, larutan disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 30 menit. Pembuatan inoculum *Bacillus Subtilis* dilakukan dengan mengembangkan bakteri dari kultur agar miring pada media NB. Sebanyak 200 ml media NB ditambahkan 2 ose bakteri *Bacillus Subtilis*, kemudian diinkubasi pada suhu 40°C, 150 rpm, selama 24 jam.

#### c. Media tumbuh

Air mineral sintetik terbuat dari KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> 0,5 g, KCl 0,1 g, FeSO<sub>4</sub> 0,8 g, CaCl<sub>2</sub> 5 g dan urea 0,6 g (D. J. Mukesh Kumar dkk, 2012). Media SM dilarutkan dengan 1000 ml aquadest, kemudian dihomogenkan dengan magnetic stirrer. Setelah dilarutkan media MSM diberi tambahan *Trace Element* sebanyak 1 ml/l yang terdiri dari ZnSO<sub>4</sub> 0,44 g, MnSO<sub>4</sub> 0,33 g, CuSO<sub>4</sub> 0,01 g. Setelah itu, larutan disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 30 menit. Selain itu media tumbuh juga diberi 10 g minyak jelantah untuk media adaptasi bakteri *Bacillus Subtilis* dalam pembuatan biosurfaktan.

### 2.3 Pembuatan Kurva Standard

Pembuatan kurva standard dilakukan dengan mengambil inoculum yang diencerkan dengan media tumbuh.

**Table 1.** Perbandingan Pembuatan Media Kurva Standart

Inokulum (ml)	Media Tumbuh (ml)
0	9
1	8
2	7
3	6
4	5
5	4
6	3
7	2
8	1
9	0

### 2.4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Membuat kurva pertumbuhan bertujuan untuk mengetahui waktu inkubasi terbaik untuk *Bacillus Subtilis*. Media yang digunakan untuk kurva standart terdiri dari 2 ml inoculum dan 18 ml media tumbuh. Media diamati jumlah selnya setiap 2 jam sekali selama 48 jam.

### 2.3 Pembuatan Starter

Sebanyak 1 ml inoculum dicampurkan pada 9 ml media tumbuh. Setelah dicampurkan untuk memperbanyak starter maka dicampurkan kembali dengan 900ml media tumbuh dan diinkubasi dengan jangka waktu terbaik yang telah didapatkan pada kurva pertumbuhan.

### 2.4 Produksi Biosurfaktan

Sebanyak 5%, 8%, 11%, 14%, 17% (v/v) dari hasil peremajaan *Bacillus Subtilis* diinokulasi ke dalam erlenmeyer 1000 ml yang berisi media tumbuh (merupakan media selektif untuk pertumbuhan bakteri penghasil biosurfaktan), minyak jelantah. Campuran lain dibuat dengan perlakuan pada pH, pH yang digunakan yaitu 6; 6,5; 7; 7,5; dan 8.

### 2.5 Analisa Biosurfaktan

Kultur bakteri yang telah diinkubasi selama disentrifugasi dengan kecepatan 9000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan sel dari supernant. Supernatan yang diperoleh diuji produksi biosurfaktannya dengan mengukur tegangan permukaan dan aktivitas emulsifikasi.

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 3.1. Hasil Penelitian Pada Pustaka Terkait

**Tabel 2.** Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Kualitas Biosurfaktan

Mikroba	Substrat	Biosurfaktan tipe	Suhu inkubasi (°C)	pH	Waktu Inkubasi (jam)	Indeks Emulsifikasi	Tegangan permukaan	Sumber
<b>Bacillus subtilis</b>	Crude oil	Lipopeptide	37,5	4	72	69%	20	[3]
<b>Bacillus subtilis</b>	Corn Step Liquor	Lipopeptide	37	7	72	59,5%	29,1	[4]
<b>S. Marcescens</b>	Gliserol	NA	30	8	120	NA	28,4	[5]
<b>S. Marcescens</b>	Glycerol, Amunium Sulfat, Peptone	NA	70	7	120	69%	33	[6]
<b>Agrobacterium Fabrum</b>	Glukosa	Lipopeptide	30	6	144	65%	32	[7]
<b>Lysinibacillus sphaericus</b>	Gliserol	rhamnolipid	30	NA	72	48%	52	[8]
<b>Bacillus subtilis</b>	Light-paraffin oil	Surfactin	37	9	96	72,5%	30%	[9]
<b>Brevibacillus sp.</b>	Used engine oil	Lipopeptide	40	7	72	72%	36	[10]
<b>Streptomyces sp.</b>	Minyak kedelai	Lipopeptide	28	8,5	144	NA	28	[11]
<b>Pseudomonas cepacia</b>	Minyak kedelai	rhamnolipid	45	NA	120	NA	30	[12]
<b>Pseudomonas cepacia</b>	Minyak Jelantah	rhamnolipid	27	NA	60	90,0%	25%	[13]
<b>Pseudomonas SWP-4</b>	Minyak Jelantah	rhamnolipid	63	7	NA	60,0%	23	[14]
<b>Bacillus cereus</b>	Minyak kacang	Lipopeptide	30	7	NA	65%	NA	[15]
<b>Acinetobacter juni</b>	Irian light crude oil	Glycolipid	37	NA	96	51,0%	38	[16]
<b>Bacillus subtilis</b>	Residu pengolahan nanas dan gliserol	NA	37	NA	24	62%	23	[17]

### 3.2 Pembahasan

#### a. Pengaruh Suhu

Kondisi lingkungan adalah peran penting dalam pertumbuhan mikroorganisme, dan produksi biosurfaktan dipengaruhi baik secara kualitatif maupun kuantitatif [4]. Pada penelitian Almansoori dkk., 2017 produksi biosurfaktan menggunakan bakteri *S. marcescens* pada suhu 30°C menghasilkan lebih banyak biosurfaktan yaitu 1,35 g/L dan terdapat penurunan tegangan permukaan terendah yaitu 27,8 N/m daripada kondisi suhu lainnya. Efek suhu pada tegangan permukaan tidak signifikan diamati pada pemanasan sampai 121°C. Aktivitas emulsifikasi tertinggi didapat pada suhu 70°C yaitu 64,9% dibandingkan dengan suhu lain. Aktivitas emulsifikasi dan aktivitas pengurangan tegangan permukaan stabil pada suhu 121°C. Biosurfaktan yang diekstraksi mempertahankan sifat permukaannya dari 30°C hingga 121°C [5]. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Datta dkk., 2018 percobaan produksi biosurfaktan menggunakan bakteri *B. subtilis* dilakukan dalam kondisi anaerob pada suhu 80°C dan 90°C selama 7 hari untuk memeriksa apakah dalam suhu tersebut strain bakteri dapat menghasilkan biosurfaktan. Sampel menunjukkan kenaikan indeks emulsifikasi pada hari 3 sebesar 62,5% dan tetap sama sampai hari ke 7.

#### b. Pengaruh pH

pH adalah salah satu faktor penting untuk mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme. Selama proses fermentasi, pH mempengaruhi metabolisme mikroorganisme yang mengakibatkan penurunan hasil biosurfaktan [9]. Pada penelitian E. Silva 2014, tegangan permukaan larutan biosurfaktan menunjukkan sedikit variasi dan tetap hampir konstan disekitar 27 N/m. Dalam penelitian [12] produksi biosurfaktan dari bakteri *P. Cepacia*, kenaikan suhu mengakibatkan interaksi antara biosurfaktan dan minyak meningkat. Sedangkan percobaan yang dilakukan oleh Gaur dkk., 2019 dilakukan pada pH 4 – 10 menunjukkan bahwa indeks emulsifikasi yang dihasilkan cenderung stabil. Namun aktivitas maksimumnya didapatkan pada pH 7. Demikian pula, indeks emulsifikasi biosurfaktan pada suhu 4°C hingga 100°C juga tidak mengalami perubahan yang signifikan.

### 4. KESIMPULAN

Kesimpulan dari telaah pustaka ini adalah sebagai berikut:

- a. Kualitas biosurfaktan dapat dilihat pada aktivitas emulsifikasinya, biosurfaktan yang baik adalah biosurfaktan yang mampu mengemulsi berbagai hidrokarbon termasuk heksana, heptana, heksadekana, bensin, minyak tanah, dan minyak mentah dengan indeks emulsifikasi 60 – 78% [2]. pH terbaik untuk pembuatan biosurfaktan terdapat pada pH antara 7 – 12, hal ini dapat dibuktikan dalam penelitian [12] yang dapat menghasilkan indeks emulsifikasi sebesar 90% dan didukung oleh teori yang diungkapkan oleh Vigneshwaran dkk., 2018 bahwa biosurfaktan sangat stabil pada kondisi basa daripada kondisi asam.
- b. Selain pada indeks emulsifikasi, kualitas biosurfaktan dapat dilihat dari aktivitas penurunan tegangan permukaannya. Biosurfaktan yang dapat dianggap efisien dan dapat diterapkan secara kompeten adalah yang dapat mengurangi tegangan permukaan air di bawah 30 N/m. Dalam konteks tersebut, [2] memproduksi biosurfaktan dari bakteri *B. subtilis* menggunakan substrat crude oil dapat

menunjukkan pengurangan tegangan permukaan maksimum pada 20 N/m dengan menggunakan suhu 37,5°C. Stabilitas suhu dapat ditentukan dari bakteri yang digunakan, pada judul telaah pustaka ini produksi biosurfaktan menggunakan bakteri *B. subtilis* maka dari itu suhu optimum yang digunakan untuk inkubasi adalah antara suhu 37 - 45°C.

## REFERENSI

- [1] Medeline, C. V., Jihan, M. F. B. (2017). Analisis Jumlah Minyak Jelantah yang Dihasilkan Masyarakat Wilayah Jabodetabek.
- [2] Kurniati, T. 2016. Bakteri Penghasil Biosurfaktan Dari Lingkungan Tercemar Limbah Minyak Dan Potensinya Dalam Mendegradasi Hidrokarbon Aromatik Polisiklik (Hap). Disertasi. Tidak Diterbitkan. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- [3] Soares da Silva, R. de C. F., Almeida, D. G., Meira, H. M., Silva, E. J., Farias, C. B. B., Rufino, R. D., Luna, J. M., & Sarubbo, L. A. (2017). Production and characterization of a new biosurfactant from *Pseudomonas cepacia* grown in low-cost fermentative medium and its application in the oil industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 206–215
- [4] Gudiña, E. J., Fernandes, E. C., Rodrigues, A. I., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2015). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Frontiers in Microbiology*, 6(FEB), 1–8.
- [5] Fadhile Almansoor, A., Abu Hasan, H., Idris, M., Sheikh Abdullah, S. R., Anuar, N., & Musa Tibin, E. M. (2017). Biosurfactant production by the hydrocarbon-degrading bacteria (*HDB*) *Serratia marcescens*: Optimization using central composite design (CCD). *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 47, 272–280.
- [6] Almansoor, A. F., Hasan, H. A., Abdullah, S. R. S., Idris, M., Anuar, N., & Al-Adiwish, W. M. (2019). Biosurfactant produced by the hydrocarbon-degrading bacteria: Characterization, activity and applications in removing TPH from contaminated soil. *Environmental Technology and Innovation*, 14(February), 100347
- [7] Sharma, S., Verma, R., & Pandey, L. M. (2019). Crude oil degradation and biosurfactant production abilities of isolated *Agrobacterium fabrum* SLAJ731. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21(August), 101322.
- [8] Gaur, V. K., Bajaj, A., Regar, R. K., Kamthan, M., Jha, R. R., Srivastava, J. K., & Manickam, N. (2019). Rhamnolipid from a *Lysinibacillus sphaericus* strain IITR51 and its potential application for dissolution of hydrophobic pesticides. *Bioresource Technology*, 272, 19–25.
- [9] Datta, P., Tiwari, P., & Pandey, L. M. (2018). Isolation and characterization of biosurfactant producing and oil degrading *Bacillus subtilis* MG495086 from formation water of Assam oil reservoir and its suitability for enhanced oil recovery. In *Bioresource Technology* (Vol. 270). Elsevier Ltd.
- [10] Vigneshwaran, C., Sivasubramanian, V., Vasantharaj, K., Krishnanand, N., & Jerold, M. (2018). Potential of *Brevibacillus* sp. AVN 13 isolated from crude oil contaminated soil for biosurfactant production and its optimization studies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(4), 4347–4356.
- [11] Santos, E. F., Teixeira, M. F. S., Converti, A., Porto, A. L. F., & Sarubbo, L. A. (2019). Production of a new lipoprotein biosurfactant by *Streptomyces* sp. DPUA1566 isolated from lichens collected in the Brazilian Amazon using agroindustry wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 142–150.

- [12] Silva, E. J., Rocha e Silva, N. M. P., Rufino, R. D., Luna, J. M., Silva, R. O., & Sarubbo, L. A. (2014). Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117, 36–41.
- [13] Soares da Silva, R. de C. F., Almeida, D. G., Meira, H. M., Silva, E. J., Farias, C. B. B., Rufino, R. D., Luna, J. M., & Sarubbo, L. A. (2017). Production and characterization of a new biosurfactant from *Pseudomonas cepacia* grown in low-cost fermentative medium and its application in the oil industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 206–215.
- [14] Lan, G., Fan, Q., Liu, Y., Chen, C., Li, G., Liu, Y., & Yin, X. (2015). Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4. *Biochemical Engineering Journal*, 101, 44–54.
- [15] Nalini, S., Parthasarathi, R., & Prabudoss, V. (2016). Production and characterization of lipopeptide from *Bacillus cereus* SNAU01 under solid state fermentation and its potential application as anti-biofilm agent. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 5, 123–132.
- [16] Ohadi, M., Dehghannoudeh, G., Shakibaie, M., Banat, I. M., Pournamdari, M., & Forootanfar, H. (2017). Isolation, characterization, and optimization of biosurfactant production by an oil-degrading *Acinetobacter junii* B6 isolated from an Iranian oil excavation site. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 1–9.
- [17] Ehrhardt, D. D., Secato, J. F. F., & Tambourgi, E. B. (2015). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using the residue from processing of pineapple, enriched with glycerol, as substrate. *Chemical Engineering Transactions*, 43, 277–282