

## Utilização de glicerol como substrato na produção de biossurfactante

Utilization of glycerol as substrate in the production of biosurfactant

Utilización del glicerol como sustrato en la producción de biosurfactantes

Recebido: 23/11/2021 | Revisado: 04/12/2021 | Aceito: 06/12/2021 | Publicado: 15/12/2021

### **Caroline Portilho Trentini-Volpato**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3650-7693>  
Universidade Estadual de Maringá, Brasil  
E-mail: carolptrentini@gmail.com

### **Michele Cristina Heck**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5869-5007>  
Universidade Estadual de Maringá, Brasil  
E-mail: michelec.heck@gmail.com

### **Adriana Aparecida Sinópolis Gigliolli**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2752-642X>  
Universidade Estadual de Maringá, Brasil  
E-mail: adrianasinopolis@hotmail.com

### **Mariana Yoshimoto-Higaki**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5748-5980>  
Universidade Estadual de Maringá, Brasil  
E-mail: mariana.yoshimoto@gmail.com

### **Mariane Aparecida Franco de Godoy**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4186-5855>  
Universidade Estadual de Maringá, Brasil  
E-mail: mariane-afg@hotmail.com

### **Diane Marques Magnoni**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9527-2428>  
Universidade Estadual de Maringá, Brasil  
E-mail: dianemagnoni@hotmail.com

### **Veronica Elisa Pimenta Vicentini**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1385-0058>  
Universidade Estadual de Maringá, Brasil  
E-mail: veronicaepvicentini@gmail.com

### **Resumo**

Os surfactantes apresentam propriedades tensoativas e formação de micelas, são compostos moleculares com porções hidrofóbicas e hidrofílicas, atuando na redução das tensões superficiais/interfaciais. No entanto, provocam danos ambientais associados à sua produção e ao seu descarte. Com o aumento da consciência sustentável e emprego da química verde, novas tecnologias para a produção de biossurfactantes estão sendo desenvolvidas. Nesse contexto, o glicerol que é um resíduo gerado em grande quantidade, devido a crescente produção de biodiesel mundialmente, pode ser utilizado como substrato na produção de biossurfactantes. Diante disso, este trabalho teve como escopo realizar uma revisão bibliográfica sobre a utilização de glicerol, coproduto na síntese de biodiesel, como substrato na produção de biossurfactantes a partir de *Bacillus subtilis*. A presente pesquisa reuniu a análise qualitativa de dados bibliográficos relacionados a produção de biossurfactantes, fatores que a influenciam, especialmente, de aplicação na área ambiental. A partir da avaliação dos trabalhos publicados na área de interesse, o levantamento bibliográfico demonstrou que o glicerol é uma fonte de carbono promissora na produção de biossurfactante, se destacando quando comparado com outras fontes alternativas. Assim como, o surfactante sintetizado pelo *B. subtilis*, demonstrou similaridade com a surfactina comercial, e potencial em processo de biorremediação de ambiente, como o solo e a água contaminados por hidrocarbonetos, metais pesados e compostos oleosos.

**Palavras-chave:** *Bacillus subtilis*; Biodiesel; Surfactina; Biorremediação.

### **Abstract**

Surfactants have surface active properties and micelle formation, they are molecular compounds with hydrophobic and hydrophilic portions, acting to reduce surface/interfacial tensions. In this context, glycerol, which is a waste generated in large quantities due to the increasing production of biodiesel worldwide, can be used as a substrate in the production of biosurfactants. Therefore, this work had as scope to perform a literature review on the use of glycerol, co-product of biodiesel synthesis, as substrate in the production of biosurfactants from *Bacillus subtilis*. The present research gathered from the qualitative analysis of bibliographic data related to the production of biosurfactants, factors that influence it, especially, of application in the environmental area. From the evaluation of published works in the

area of interest, the bibliographic survey showed that glycerol is a promising carbon source in the production of biosurfactant, standing out when compared to other alternative sources. As well, the surfactant synthesized by *B. subtilis*, showed similarity with commercial surfactin, and potential in environmental bioremediation process, such as soil and water contaminated by hydrocarbons, heavy metals and oily compounds.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*; Biodiesel; Surfactin; Bioremediation.

### Resumen

Los surfactantes tienen propiedades tensioactivas y formación de micelas, son compuestos moleculares con porciones hidrofóbicas e hidrofílicas, que actúan para reducir las tensiones superficiales/interfaciales. Sin embargo, causan daños ambientales asociados con su producción y eliminación. Con el aumento de la conciencia sostenible y el uso de la química verde, se están desarrollando nuevas tecnologías para la producción de biosurfactantes. En este contexto, el glicerol, que es un desecho generado en grandes cantidades, debido a la creciente producción de biodiesel a nivel mundial, puede ser utilizado como sustrato en la producción de biosurfactantes. Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo realizar una revisión bibliográfica sobre el uso de glicerol, un coproducto en la síntesis de biodiesel, como sustrato en la producción de biosurfactantes a partir de *Bacillus subtilis*. La presente investigación recogió el análisis cualitativo de datos bibliográficos relacionados con la producción de biosurfactantes, factores que influyen en ella, especialmente, de aplicación en el área ambiental. A partir de la evaluación de trabajos publicados en el área de interés, el levantamiento bibliográfico mostró que el glicerol es una fuente de carbono promisoría en la producción de biosurfactantes, destacándose frente a otras fuentes alternativas. Asimismo, el surfactante sintetizado por *B. subtilis* mostró similitud con la surfactina comercial y potencial en procesos de biorremediación ambiental, como suelos y aguas contaminadas con hidrocarburos, metales pesados y compuestos aceitosos.

**Palabras clave:** *Bacillus subtilis*; Biodiesel; Surfactina; Biorremediación.

## 1. Introdução

A produção de biocombustíveis, procura desenvolver a sustentabilidade da matriz energética, a partir de fontes alternativas aos combustíveis fósseis. Neste contexto, o biodiesel vem sendo utilizado na substituição total/parcial dos combustíveis derivados do petróleo, por ser um combustível renovável, biodegradável, bem como, por emitir menos poluentes gasosos e materiais particulados (Malt & Souza, 2019). No entanto, a ampliação da produção de biodiesel e o aumento gradual da adição de biodiesel ao diesel, aponta a grande disponibilidade de glicerol no mercado brasileiro. Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP em 2020, foram gerados 580,1 mil m<sup>3</sup> de glicerina como subproduto da produção de biodiesel (B100), 13,3% a mais que em 2019 (ANP, 2021).

O glicerol apresenta inúmeras aplicações industriais consagradas, principalmente, na manufatura de drogas, cosméticos, uretanos, resinas alquídicas, celofane e explosivos (Tan et al., 2010), além da sua aplicação em rotas químicas emergentes, tais como, 1,3-propanediol, acroleína, hidrogênio, emulsificantes alimentícios, entre outros (Rahmat et al., 2010). No entanto, sua aplicação industrial não absorverá grandes aumentos na oferta deste produto, tornando-se problema do ponto de vista comercial, visto que ocorrerá um excedente no mercado. Esse fator aumenta a possibilidade do glicerol tornar-se um resíduo, portanto, a aplicação desse coproducto em outros processos deve ser considerada, bem como, seu uso como sustrato para a produção de biosurfactantes (Sousa et al., 2012), possibilitando substituir fontes de carbono tradicionais, na geração de um produto biotecnológico de baixo custo para a aplicação na área ambiental (Silva, 2009).

Biosurfactantes são grupos de compostos químicos produzidos por bactérias, fungos ou leveduras, que também possuem característica anfipática, agindo como emulsificadores de hidrocarbonetos (Ehrhardt et al., 2015). Essas interações superficiais são mediadas pela natureza das moléculas, que possuem regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, permitindo que atuem como surfactantes nas interfaces entre os componentes aquosos e não aquosos de um sistema complexo e na interface do gás/líquido (Marchant & Banat, 2012).

Esses compostos químicos têm várias vantagens potenciais sobre os surfactantes sintéticos, como menor toxicidade, maior biodegradabilidade e interação benigna com o meio ambiente (Oliveira et al., 2013). Além disso, eles podem possuir valores mais baixos de concentração crítica de micelização do que os surfactantes sintéticos, melhorando sua eficiência em

diversas aplicações. Dentre elas, uma promissora atividade de biorremediação ambiental, devido à sua baixa toxicidade e propriedades físico-químicas úteis na área ambiental (Jahan et al., 2020).

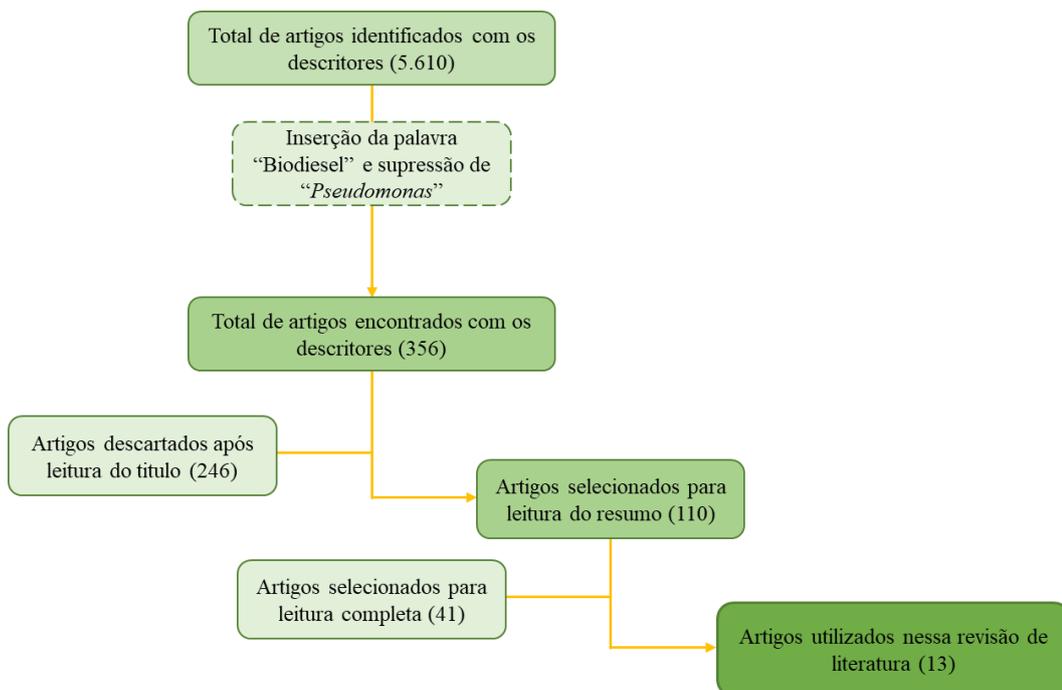
Os microrganismos têm a capacidade de metabolizar compostos relacionados ao óleo, permitindo eliminar poluentes hidrofóbicos e, assim, aumentar a biorremediação de hidrocarbonetos por vários mecanismos (Jahan et al., 2020). Dentre eles, a bactéria *Bacillus subtilis* tem sido considerada adequada para a produção de biossurfactantes, devido à ausência de patogenicidade, o que permite a utilização de seus produtos nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Fernandes et al. (2016), isolaram *Bacillus subtilis* da água e caracterizaram esta bactéria como produtora de biossurfactantes e outros compostos que atuam sinergicamente na mobilização de óleo. Dentre os biossurfactantes, destacam-se lipopeptídeos como a surfactina, o qual, apresenta grande potencial para aplicações biotecnológicas e biofarmacêuticas (Yuliani et al., 2018).

Neste sentido, o trabalho visou apresentar os principais processos de síntese de biossurfactantes a partir de *Bacillus subtilis* utilizando o glicerol como fonte de carbono, relatar a relação entre este e o substrato, assim como, a sua aplicação na área ambiental.

## 2. Metodologia

O presente trabalho consistiu em uma proposta de revisão bibliográfica, utilizando a revisão sistemática, é um estudo retrospectivo, visando sintetizar as evidências produzidas por estudos primários sobre uma determinada questão específica (Casarin et al., 2020). A pesquisa foi conduzida nas bases de dados Scielo, PubMed, Science Direct e Google Scholar, em idioma português e inglês, inicialmente com as seguintes descritores, “Biossurfactante”, “glicerol”, “*Bacillus subtilis*”, posteriormente visando refinar os resultados foi incluído o descritor “Biodiesel” e realizada a supressão da palavra *Pseudomonas*. Esta revisão foi realizada considerando trabalhos no período de 2011 a 2022. A análise de dados foi realizada em três etapas conforme pode ser visualizado no Fluxograma 1.

**Figura 1** - Fluxograma da seleção de estudos para discussão.



Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

Na primeira etapa, os títulos dos artigos encontrados foram lidos, sendo selecionados aqueles que apresentaram termos relacionados com biossurfactantes de *Bacillus subtilis* e glicerol. Na segunda etapa, as publicações foram analisadas pela leitura dos *abstracts*, selecionando os que mencionavam algum estudo sobre o potencial glicerol na produção de biossurfactantes. E por fim, na terceira etapa, os artigos foram lidos integralmente e avaliados quanto à produção de biossurfactante a partir de *Bacillus subtilis*, utilizando diferentes proporções de glicerol como fonte de carbono, e sua aplicação ambiental, sendo utilizado a abordagem de aspectos qualitativos.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Resultados

A partir das etapas de pesquisa dos artigos, utilizando a base de dados do Google Scholar foram encontrados diversos trabalhos utilizando os termos de pesquisa “*Bacillus subtilis* glycerol biosurfactant”. A base de dados do Google Scholar foi utilizada preferencialmente, pois reúne materiais acadêmicos de outras bases de dados como, Scielo, Wiley, Science Direct e PubMed. No entanto, também foi realizada a pesquisa nessas bases de dados, considerando o cenário de que a ferramenta do Google Scholar tenha realizado alguma omissão de fonte.

Baseado nesses resultados de pesquisa, foi iniciada a análise dos artigos, alguns já foram descartados pela leitura do título e resumo, pois utilizaram outro microrganismo ou aplicaram outros tipos de substratos como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes e não o glicerol como foi o objetivo deste trabalho. Após verificação dos artigos selecionados, os mesmos foram lidos integralmente, observados seus resultados em relação à utilização de glicerol como fonte principal de carbono na produção de biossurfactantes e sua aplicação ambiental. Os estudos selecionados são apresentados na Tabela 1, os trabalhos foram estudados considerando uma análise de conteúdo com interpretação qualitativa (Caregnato & Mutti, 2006).

**Tabela 1** - Estudos utilizados nos resultados e discussão.

Títulos dos estudos	Referências
Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by <i>Bacillus subtilis</i> isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry	Faria et al. (2011)
Screening of biosurfactant-producing <i>Bacillus</i> strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source	Sousa et al. (2012)
Optimization and characterization of biosurfactant production by <i>Bacillus subtilis</i> isolates towards microbial enhanced oil recovery applications	Pereira et al. (2013)
Strategy of Using Waste for Biosurfactant Production Through Fermentation by <i>Bacillus Subtilis</i>	Santos et al. (2014)
Performance of a biosurfactant produced by <i>Bacillus subtilis</i> lami005 on the formation of oil / biosurfactant / water emulsion: study of the phase behaviour of emulsified systems	Sousa et al. (2014)
Production of a biosurfactant by <i>Bacillus subtilis</i> ICA56 aiming bioremediation of impacted soils.	França et al. (2015)
Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by <i>Bacillus subtilis</i> CN2	Bezza & Chirwa (2015)
Strategy for waste management in the production and application of biosurfactant through surface response methodology	Santos et al. (2016)
Biosurfactant Production by Marine-Originated Bacteria <i>Bacillus Subtilis</i> and Its Application for Crude Oil Removal	Zhu et al. (2016)
Optimization Techniques and Development of Neural Models Applied in Biosurfactant Production by <i>Bacillus subtilis</i> Using Alternative Substrates	Secato et al. (2017)
Agricultural Feedstock Supplemented with Manganese for Biosurfactant Production by <i>Bacillus subtilis</i>	Cruz et al. (2018)
Enhanced valorization of industrial wastes for biodiesel feedstocks and biocatalyst by lipolytic oleaginous yeast and biosurfactant-producing bacteria	Louhasakul et al. (2020)
Sustainable Surfactin Production by <i>Bacillus subtilis</i> Using Crude Glycerol from Different Wastes	Janek et al. (2021)

Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

No processo de síntese do biossurfactante foram encontrados artigos que avaliaram diferentes parâmetros, sendo encontrado tempos de fermentação de 24 horas a 5 dias, já as temperaturas consideradas foram a ambiente e alguns trabalhos

apresentando isotermas que variaram de 30 a 40 °C. Agitação quando presente foi realizada entre 150 e 250 rotações por minuto (rpm), e o controle do pH 7 em alguns experimentos. A variável oxigenação também foi verificada sendo reportados valores entre 0,5 e 1 de volume de ar por volume de meio por minuto (vvm) em dois estudos. O percentual de glicerol utilizado na fermentação variou entre 1 e 16% (v/v). A partir dos surfactantes sintetizados com *B. subtilis*, foi observado uma produção de biossurfactante bruto de 263,6 a 1931 mg L<sup>-1</sup>.

Dentre as aplicações ambientais, o biossurfactante foi aplicado nos processos de biorremediação/remoção de petróleo bruto, óleo de motor, hidrocarbonetos, metais pesados (cromo, zinco e cobre) de solos e areias contaminada, assim como também foi verificada sua aplicação na remoção de óleo e DQO (Demanda Química de Oxigênio) de efluentes.

## 3.2 Discussão

### 3.2.1 Glicerol como substrato na produção de *Bacillus subtilis*

Apesar das inúmeras vantagens dos biossurfactantes sobre os tensoativos químicos sintéticos, o problema relacionado à produção em larga escala e o custo ainda representam um obstáculo, especialmente, visando seu uso comercial (Makkar et al., 2011). Por essa razão, fontes alternativas de substrato precisam ser avaliadas. Dentre elas, o glicerol tem sido utilizado como a fonte principal de carbono na produção de biossurfactante por meio de diferentes cepas de *Bacillus*.

Faria et al. (2011), avaliaram a aplicação do glicerol, considerado uma matéria-prima de baixo custo, a concentração de 5% (v/v), utilizando *Bacillus subtilis* LSFM-05 para produção de biossurfactante em um meio de cultura com micronutrientes. Após purificação e isolamento do biossurfactante, constatou-se a presença do lipopeptídeo surfactina (C<sub>14</sub>/Leu<sub>7</sub>). A concentração máxima desse surfactante (1370 mg L<sup>-1</sup>) foi constatada na fase de crescimento máximo, demonstrando que sua produção está relacionada ao crescimento de *B. subtilis*. Além disso, a surfactina obtida é muito semelhante à surfactina padrão comercial da Sigma-Aldrich. Os autores avaliaram a atividade emulsificante do biossurfactante obtido em diferentes hidrocarbonetos, sendo os maiores índices de emulsificação obtidos para o óleo cru (67,6%), querosene (59,1%) e tetradecano (58%).

A viabilidade da produção de biossurfactantes a partir do glicerol residual foi reportada por Sousa et al. (2012), ao avaliarem sete cepas de *B. subtilis* e glicerol bruto neutralizado. As cepas de *B. subtilis* foram cultivadas em meio mineral, contendo 2% (v/v) de glicerol e 0,1% (v/v) de solução de micronutrientes. Nessas condições, quatro cepas foram capazes de reduzir a tensão superficial para níveis de 30 mN m<sup>-1</sup>, ou seja, atingiram o critério da seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes. Dentre essas quatro cepas, apenas duas (LAMI009 e LAMI005), demonstraram capacidade de emulsificação contra as fases líquidas não aquosas testadas (óleo de soja, querosene e *N*-hexadecano), sendo a maior atividade emulsificante observada quando o óleo de soja foi usado como composto hidrofóbico. Além disso, os autores observaram que os biossurfactantes produzidos pelas duas cepas, apresentaram estrutura molecular semelhante ao padrão de surfactina comercial.

Já no estudo de Pereira et al. (2013), foram investigados diferentes substratos, incluindo o glicerol (comercial). O meio de cultivo consistiu em uma solução de micronutrientes (1g L<sup>-1</sup>), glicerol (10g L<sup>-1</sup>) e nitrato de amônio (2g L<sup>-1</sup>). Nessas condições foram avaliados três isolados de *B. subtilis* (#309, #311 e #573), os resultados demonstraram que todas as cepas estudadas apresentaram atividade emulsificante, sendo que para o isolado #573, a maior atividade emulsificante (48,4%) foi obtida utilizando o glicerol como fonte de carbono, com produção de 965,3 mg L<sup>-1</sup> de surfactina.

A produção de biossurfactante através da fermentação por *B. subtilis* usando substratos alternativos baseados em resíduos de glicerina do processo de produção de biodiesel, casca de beterraba e licor de maceração de milho, foram avaliados por Santos et al. (2014). Os autores aplicaram um planejamento fatorial e avaliaram diferentes proporções dos substratos, sendo que a melhor condição apresentou um valor de 55,53±0,99% para o Índice de Emulsificação e 389±50 mg L<sup>-1</sup> para a concentração bruta de biossurfactante para o substrato com 5% de glicerina e 3,5% casca de batata.

A produção de surfactina a partir da aplicação de glicerol no substrato de *B. subtilis* LAMI005, foi demonstrada por Sousa et al. (2014), que encontraram um valor máximo de 263,64 mg L<sup>-1</sup> de surfactina em 30 horas de cultivo. O comportamento do biossurfactante produzido foi avaliado em sistemas formados a partir de uma fase aquosa (água a pH 8,0 e 0,8 g L<sup>-1</sup> de biossurfactante) e uma fase oleosa (óleo de motor, óleo mineral (NH140) ou óleo de mamona), e, demonstrou potencial de uso como agente estabilizador para emulsões óleo-em-água, apresentando uma atividade eficaz como agente emulsionante para óleos que apresentam maior viscosidade.

França et al. (2015), utilizaram resíduos agroindustriais (glicerol, óleo de girassol, soro de queijo e suco de caju) como substratos alternativos para a produção de biossurfactante, visando reduzir os custos do bioprocesso. Verificaram que o glicerol foi a melhor fonte de carbono, com rendimento de 1290 mg L<sup>-1</sup> de biossurfactante bruto, redução da tensão superficial da água para 28 mN m<sup>-1</sup> e índice de emulsificação de 92%. Do mesmo modo, o efeito do pH, temperatura e salinidade nas propriedades tensoativas e emulsificantes do biossurfactante bruto produzido por *B. subtilis* ICA56 também foram avaliados. Os resultados demonstraram que a tensão superficial permaneceu abaixo de 40 mN m<sup>-1</sup> e o índice de emulsificação foi superior a 50%, independente do pH avaliado, assim como, a variação da temperatura de 4 °C para 75 °C, não proporcionou mudanças significativas, similarmente, o biossurfactante demonstrou estabilidade em concentrações de NaCl <20%, portanto, o biossurfactante produzido é um tensoativo e emulsificante eficaz.

O isolamento de cepas bacterianas com potencial de degradação de hidrocarbonetos e produtoras de biossurfactante foi investigado por Bezza e Chirwa (2015). Nesse estudo, o glicerol foi utilizado como fonte de carbono e isoladas 7 cepas de *B. subtilis*. O isolado CN2, apresentou maior produção de biossurfactante de natureza lipopeptídica e baixou a tensão superficial do caldo de cultura de 72 para 32 mN m<sup>-1</sup> em 72 h de incubação. O biossurfactante apresentou índices de emulsificação de aproximadamente 76% para óleo de motor usado, 82% para hexano e 84% para o ciclohexano. Na avaliação de estabilidade, o biossurfactante permaneceu constante na faixa de temperatura de 25 a 125 °C, pH de 5 a 12 e salinidade 5 a 20%.

A avaliação da glicerina como substrato visa simular a utilização do glicerol obtido na produção de biodiesel e, além de fonte de carbono, possui sais minerais devido ao óleo natural, utilizado na reação de transesterificação. A partir disso, Santos et al. (2016), estudaram a aplicação da glicerina e outros substratos naturais na produção de biossurfactantes via fermentação por *B. subtilis*. A condição selecionada a partir de planejamento fatorial (condição ótima), foi 9% de glicerina e 1% de resíduo de batata (v/v), condição que apresentou maior atividade emulsificante (100% em tolueno). Além disso, hexano e óleo de soja apresentaram aproximadamente 60% de atividade emulsificante para ambos. Quando a tensão superficial da água foi testada, o biossurfactante foi capaz de reduzir a tensão da água de 71 para 31 mN m<sup>-1</sup>.

*B. subtilis* N3-4P foi identificado como promissor para a produção de um biossurfactante que consistia em uma mistura de lipopeptídeo e glicolípídeo. Zhu et al. (2016) avaliaram a aplicação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, sendo que o melhor desempenho na produção do biossurfactante foi observada utilizando glicerol e nitrato de sódio e extrato de levedura como substratos, resultando em menor tensão superficial com o valor de 27,8 mN m<sup>-1</sup> e com concentração de surfactante necessária para iniciar a formação de micelas de 0,507 g L<sup>-1</sup>. O biossurfactante demonstrou estabilidade (24 horas), em diferentes condições ambientais, na faixa de temperatura 0 a 100 °C, pH 2 a 8 e salinidade de 1 a 4%. A produção otimizada de biossurfactante por meio da fermentação por *B. subtilis* a partir de substratos alternativos (glicerol e resíduos da indústria de doces), foi avaliada por Secato et al. (2017) e, verificaram valores ótimos encontrados em condições de 3,2% (v/v) para resíduos de doces e 16% (v/v) de glicerol bruto a partir da aplicação de um planejamento fatorial e obtiveram uma produção máxima de biossurfactante bruto de 668 ± 40 mg L<sup>-1</sup>.

A produção de surfactina por *B. subtilis* em meio com glicerol, considerado fonte de carbono de baixo custo, e suplementado com sais de manganês foi avaliado por Cruz et al. (2018) e obtiveram o melhor crescimento de *B. subtilis* em

meio com 5% (v/v) de glicerol, sem que houvesse mudança do pH ou inibição do crescimento do microrganismo. Assim, o meio contendo 5% de glicerol e suplementado com 0,01 e 0,05 mM de  $\text{MnSO}_4$  produziu 740 e 793  $\text{mg L}^{-1}$  e uma capacidade de reduzir a tensão superficial do meio em 39 e 38%, respectivamente.

Biossurfactante do tipo lipopeptídico produzido a partir da cepa de *B. Subtilis* TD4 em meio de cultivo com 20  $\text{g L}^{-1}$  glicerol bruto resultou na produção de 1180  $\text{mg L}^{-1}$  de biossurfactante, contudo, o aumento da concentração de biossurfactante, devido a formação de micelas, diminuiu a tensão superficial da água rapidamente de 70 para 34  $\text{mN m}^{-1}$  (Louhasakul et al., 2020). Buscando a sustentabilidade nos processos de produção de surfactina, por *Bacillus subtilis* #309, Janek et al. (2021), avaliaram a aplicação do glicerol bruto derivado de diferentes fontes residuais (produção de biodiesel, de sabão e de estearina) e o glicerol puro como referência. Os autores reportam, que quando utilizado 40  $\text{g L}^{-1}$  de glicerol residual, em 48 horas de cultivo, este apresentou uma produção de surfactina de 1,2  $\text{g L}^{-1}$  e tensão superficial de  $\sim 29 \text{ mN m}^{-1}$ , valor superior ao obtido com glicerol puro para a surfactina (0,5  $\text{g L}^{-1}$ ) e similar para a tensão superficial ( $\sim 28 \text{ mN m}^{-1}$ ), e com atividade emulsificante de  $\sim 61\%$  e  $58\%$ , respectivamente para glicerol bruto e puro. No entanto, os autores ressaltam que apesar dos resultados promissores, a escalabilidade do processo deve ser mais investigada, visando o desenvolvimento de um bioprocessos sustentável.

### 3.2.2 Métodos de síntese de biossurfactantes a partir de glicerol

Os surfactantes produzidos por microrganismos podem ser obtidos através de processos fermentativos, que são procedimentos simples e de baixo custo, especialmente, quando utilizados substratos alternativos. Meios de cultura são preparados visando fornecer ao microrganismo os nutrientes necessários, além disso, é possível controlar algumas condições do meio, como pH, temperatura, agitação, oxigenação e tempo de fermentação.

A fermentação, conduzida sem controle de pH, realizada em um fermentador de bancada, com um volume de trabalho de 10 L, foi reportada por Faria et al. (2011). Para tanto, o glicerol, substrato orgânico, foi adicionado ao meio de sal mineral na concentração de 5% (v/v), como única fonte de carbono. O meio de cultura foi inoculado com 106 UFC (unidade formadora de colônia)  $\text{mL}^{-1}$ , e, a fermentação, foi realizada a 32 °C por 72 h, com agitação a 250 rpm, oxigenação a 0,5 vvm e na ausência de agente químico antiespumante. O cultivo realizado por Sousa et al. (2012), foi preparado em frascos Erlenmeyer de 250 ml com 50 ml de meio de cultura em agitador rotativo a 180 rpm, 30 °C e por 72 h. Foi utilizado 1% (v/v) do inóculo, avaliando a atividade de 7 cepas, cultivadas em meio mineral, contendo 2% (v/v) de glicerol, como fonte de carbono e 0,1% (v/v) de solução de micronutrientes. Apenas duas cepas, demonstraram capacidade de emulsificação contra as fases líquidas não aquosas testadas, sendo que a surfactina produzida demonstrou estrutura molecular semelhante à da surfactina comercial padrão.

A partir desses dados, Sousa et al. (2014), avaliaram a produção de biossurfactante de cepas (Sousa et al., 2012), em um biorreator de 4 L operando com 3 L, utilizando no meio de cultura 20  $\text{g L}^{-1}$  de glicerol como fonte de carbono e solução de macro e micronutrientes, adicionando de 10% (v/v) de inóculo (0,82  $\text{g L}^{-1}$ ) no processo fermentativo, conduzido a 30 °C, 200 rpm e com 1  $\text{L min}^{-1}$  de aeração. Nessas condições, a produção de biossurfactante foi de 263,64  $\text{mg L}^{-1}$  após 72 horas, obtendo-se um lipopeptídico cíclico comparável à surfactina comercialmente.

O isolado bacteriano avaliado por Bezza e Chirwa (2015), foi inoculado em 25 mL de caldo nutriente estéril a 37 °C agitado a 150 rpm em um agitador rotativo orbital (Shaker) por 24 h. A produção de biossurfactante por *B. subtilis* CN2, foi realizada em frascos cônicos de 1000 mL contendo 500 mL de meio de sal mineral suplementado com 4% (v/v) glicerol. O frasco foi inoculado com 5 mL do inóculo preparado anteriormente a 37 °C e 150 rpm e pH 7 e, posteriormente, incubado a 37 °C, pH 7 e 150 rpm por 96 h. Foi observada a formação de micelas após 72 horas de fermentação.

O meio de cultura para produção do biossurfactante reportado por Cruz et al. (2018), foi composto por 50 mL do meio mineral de Bushnell-Haas, sulfato de manganês ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  99,6%) (0,01 e 0,05 mM) visando maior produtividade de biossurfactante e testadas diferentes concentrações de glicerol (5, 7 e 9% v/v). O crescimento bacteriano foi monitorado medindo a densidade óptica a 600 nm, a partir de uma curva de calibração construída para relacionar a absorvância com o peso seco da célula. Os frascos foram incubados em um agitador rotativo a 180 rpm e 35 °C por 72 horas. O pH do meio de produção foi medido após a fermentação. O meio com 5% (v/v) de glicerol suportou o melhor crescimento de *B. subtilis* e o pH do meio ficou em torno de 6, além disso, a adição de 0,01 ou 0,05 mM de  $\text{MnSO}_4$  no meio, aumentou o crescimento microbiano em todas as concentrações de glicerol avaliadas.

O crescimento e a produção de biossurfactante com três isolados de *B. subtilis* e com distintas fontes de carbono, foram estudados por Pereira et al. (2013). As fontes de carbono avaliadas na concentração de 10 g L<sup>-1</sup> foram acetato de sódio, citrato de sódio, frutose, glicose, glicerol, n-hexadecano, lactose, extrato de carne, parafina, sacarose, triptona e extrato de levedura, usando nitrato de amônio como fonte de nitrogênio (2 g L<sup>-1</sup>). Todos os meios foram ajustados para pH 7,0. Os ensaios foram realizados em frascos de 100 mL contendo 50 mL dos diferentes meios. Cada frasco foi inoculado com 1% de uma pré-cultura cultivada no mesmo meio por 24 horas. As culturas foram incubadas a 40 °C sem agitação durante 120 horas. As amostras foram coletadas em diferentes períodos do processo de fermentação, para determinar a concentração de biomassa e a produção de biossurfactante. O crescimento bacteriano foi determinado medindo a densidade óptica a 600 nm. Os autores observaram para o isolado #573 uma produção de 956,3 mg L<sup>-1</sup> de surfactina em 120 h de fermentação.

Substratos como glicerol, soro de queijo, suco de caju clarificado, óleo de girassol e glicose, foram utilizados como fontes de carbono na fermentação com *B. subtilis* ICA56 por França et al. (2015). Juntamente com esses substratos, foram adicionados um meio mineral com concentração inicial de substrato de 20 g L<sup>-1</sup>. A produção do biossurfactante foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio mineral. Uma alíquota de 10 mL (10% v/v) da cultura foi transferida para o Erlenmeyer e os experimentos foram realizados em agitador rotativo a 150 rpm, 30 °C, por 48 horas. O glicerol foi a melhor fonte de carbono para a produção de biossurfactante, rendendo 1290 mg L<sup>-1</sup> de biossurfactante bruto.

Considerando hexadecano, glicose e sacarose como fontes de carbono, e, a fermentação conduzida em frascos de 1 L contendo 600 mL de meio, Zhu et al. (2016) consideraram um meio de cultura com 10 g L<sup>-1</sup> de substratos separadamente, fontes de nitrogênio e extrato de levedura como aditivo e solução de oligoelementos 0,5 mL L<sup>-1</sup> em água destilada. O meio foi incubado com agitação a 200 rpm por 5 dias em temperatura ambiente. A partir da investigação, o glicerol apresentou maior taxa de produção como fonte de carbono, considerando o extrato de levedura e nitrato de sódio como fontes de nitrogênio. A solução de biossurfactante reduziu a tensão superficial da água destilada para 27 mN m<sup>-1</sup>.

O glicerol puro ou glicerol bruto de quatro diferentes indústrias foram utilizados por Janek et al. (2021) como fonte de carbono e adicionado ao meio salino mineral (MSM) a uma concentração de 20 ou 40 g L<sup>-1</sup>, que corresponde a razões C/N de 5,5 e 11, respectivamente. Todos os meios de cultura foram ajustados para pH 7. As culturas foram realizadas em frascos de agitação de 100 mL contendo 30 mL de MSM e incubados a 37 °C e 160 rpm em um agitador rotativo por 96 horas. Conforme os autores, o glicerol foi esgotado entre 48 e 72 horas de crescimento e após o consumo do glicerol, a surfactina foi rapidamente utilizada pela bactéria como fonte de carbono.

Alguns trabalhos utilizaram ferramentas estatísticas, com o objetivo de aprimorar a produção dos biossurfactantes. Após verificar a produção de biossurfactante em frascos Erlenmeyer (250 mL), que demonstrou uma concentração máxima de biossurfactante bruto de 550 ± 85 mg L<sup>-1</sup>, Santos et al. (2014) conduziram experimentos em um biorreator de 7 L (volume de fermentação de 4 L) equipado com sondas padrão para temperatura e oxigênio dissolvido. A composição do meio alternativo foi 6% (v/v) de glicerol da produção de biodiesel e 7,5% (v/v) de casca de beterraba de restaurantes, determinada na fermentação com erlenmeyer. O pH foi ajustado para aproximadamente 7, usando NaOH ou HCl. Cada lote foi executado por

24 horas e a amostragem realizada a cada 3 horas. Os autores utilizaram um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), para otimizar o processo fermentativo, atingindo na melhor condição valores de 1931,2 mg L<sup>-1</sup> de concentração bruta de biossurfactante, os valores ótimos de operação determinados foram 200 rpm (agitação) e 0,5 vvm (aeração).

Um delineamento experimental DCCR também foi reportado por Santos et al. (2016), para investigar a produção de biossurfactante, com alguns substratos residuais incluindo glicerina da produção de biodiesel, óleo de fritura, licor de maceração de milho e água do descascamento de batatas. Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL e volume de fermentação de 100 mL, com as proporções determinadas pela combinação do planejamento fatorial para cada variável (diferentes proporções de substrato). O pH foi ajustado para aproximadamente 7, usando NaOH ou HCl. Os frascos foram autoclavados, inoculados e incubados em agitador orbital, a 100 rpm, 37 °C por 96 horas. A condição ótima foi obtida quando utilizado 9% de glicerina e 1% de resíduo de batata (v/v), que forneceu um índice de emulsificação após 24 horas (EI<sub>24</sub>) de até 100%.

Na produção de biossurfactante com substratos alternativos (resíduos de doces e glicerol bruto) investigados por Secato et al. (2017), foram observadas interações entre as variáveis e os valores ótimos das concentrações dos substratos, com um DCCR, metodologia de superfície de resposta (RSM) e rede neural artificial (RNA), visando otimizar a produção do biossurfactante. As diferentes concentrações dos substratos residuais foram avaliadas, considerando resíduos da indústria de doces e glicerol da produção de biodiesel. A fermentação foi realizada em 100 mL de meio em frascos Erlenmeyer de 250 mL em agitador orbital, a 100 rpm, 37 °C, por 96 horas. Os valores ótimos encontrados foram 3,2 % (v/v) para resíduos de doces e 16 % (v/v) concentrações de glicerol bruto, produzindo 668 ± 40 mg L<sup>-1</sup> de biossurfactante bruto.

### 3.2.3 Aplicação de biossurfactante

Os compostos de petróleo são resistentes à degradação microbiana e persistem nos ecossistemas devido à sua alta hidrofobicidade, contaminando todo o ambiente (Bezza & Chirwa, 2015). Neste sentido, é importante desenvolver tecnologias que possibilitem a degradação de compostos contaminantes, como a produção de biossurfactante por microrganismos.

O biossurfactante bruto, biossintetizado (*B. subtilis* ICA56) com o emprego do glicerol como principal substrato, demonstrou potencial para ser usado na biorremediação, e, além disso, é atóxico, conforme ecotoxicidade avaliada no microcrustáceo *Artemia salina*, conforme relatado por França et al. (2015), e constataram que o biossurfactante foi capaz de remover com eficiência hidrocarbonetos e metais pesados de sistemas contaminados. O biossurfactante bruto apresentou potencial de 76,9% para remoção de óleo bruto da areia contaminada, resultado similar ao obtido com o tensoativo químico (TritonX-100), cuja remoção foi de 76,1%.

O potencial de remoção de metais pesados como zinco, cromo e cobre em efluente contaminado, também foi investigado. O biossurfactante apresentou eficiência similar na remoção destes compostos em comparação ao Triton X-100. A partir da seleção do isolado de *B. subtilis* CN2, que apresentou potencial de produção de biossurfactante, Bezza e Chirwa (2015), avaliaram a aplicação do biossurfactante na remoção de óleo de motor usado da areia contaminada, e, os resultados mostraram uma recuperação de aproximadamente 84% do óleo de motor usado das areias contaminadas no sobrenadante livre de células de *B. subtilis* CN2 e 15% para o controle (água destilada), demonstrando que o biossurfactante produzido tem aplicação potencial na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos e com borra de petróleo.

A aplicação do biossurfactante produzido a partir da fermentação por *B. subtilis* com o uso de glicerina como fonte principal de carbono é reportada por Santos et al. (2016), que realizaram ensaios de recuperação de óleo em areia contendo óleo residual. A solução com o biossurfactante produzido a partir de 9% de glicerina e 1% de resíduo de batata, foi capaz de remover mais óleo da areia do que água, confirmando que o biossurfactante pode ser adequado no tratamento de áreas com contaminação por óleo.

O biossurfactante produzido a partir *B. subtilis* N3-4P, utilizando como fonte de carbono o glicerol, foi aplicado em um sistema de solo contaminado e se apresentou altamente eficaz na limpeza de petróleo bruto. Conforme reportado por Zhu et al. (2016), que aplicaram diferentes concentrações de biossurfactante bruto, verificou-se que 58% óleo bruto pode ser removido do sistema de solo com 4 g L<sup>-1</sup> de biossurfactante e, 65,2% deste óleo, removido por 8 g L<sup>-1</sup> de biossurfactante. Já o sistema de controle (água), pode limpar apenas 36,9% do óleo bruto do solo contaminado. Portanto, a remoção de óleo bruto foi significativamente maior usando solução de lavagem à base de biossurfactante.

Uma aplicação na remediação de espalhamento de óleo foi simulada por Secato et al. (2017). Esses autores verificaram que o biossurfactante bruto foi capaz de produzir uma zona clara, em comparação com o controle, em ensaios de placas de Petri. Os resultados indicaram sucesso na utilização dos resíduos de glicerol e da indústria de doces como substratos para *B. subtilis* na produção do biossurfactante.

O efeito do biossurfactante na DQO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e na remoção de óleo do efluente foi investigado por Louhasakul et al. (2020) e comparado com surfactantes sintéticos. Os autores verificaram que a adição de biossurfactante, proporcionou a maior remoção de DQO de ~88 %, enquanto não houve melhora com a adição de surfactantes sintéticos, já para a remoção de óleo do efluente, ocorreu um aumento de 34 para aproximadamente 71% quando foi adicionada biossurfactante a cultura, 75% com adição do Tween 20 e 76%, quando adicionado o Tween 80, resultados similares aos obtidos pelos surfactantes sintéticos.

#### 4. Considerações Finais

A bactéria *B. subtilis* apresenta uma grande versatilidade em relação aos substratos usados nos meios de fermentação, produzindo biossurfactante com elevados níveis de emulsificação, com destaque para o glicerol como fonte de carbono. Além potencial biotecnológico para a recuperação de áreas ambientais contaminadas, com destaque para a biorremediação em solos e águas poluídas, esse processo proporciona a valorização do glicerol bruto, coproduto da síntese de biodiesel, o que torna ambos processos mais atrativos economicamente e sustentáveis.

A síntese microbiana efetiva de surfactina depende da composição do meio de cultivo, das condições de cultivo, assim como do potencial genético da cepa produtora. Além disso, dos custos relacionados a produção e aplicação em alta escala precisam ser considerados, reforçando a importância de estudos com substratos alternativos e domínio das condições de cultivo, visando promover o desenvolvimento da produção industrial da surfactina.

#### Referências

- ANP, Agência Nacional do Petróleo, G. N. E. B. (2021). Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2021. *Anp/Mme*, 8–247. <https://www.gov.br/anp> e <https://www.gov.br/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes>
- Bezza, F. A., & Chirwa, E. M. N. (2015). Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. *Biochemical Engineering Journal*, 101, 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.007>
- Caregnato, R. C. A., & Mutti, R. (2006). Pesquisa qualitativa: análise de discurso versus análise de conteúdo. *Texto Contexto Enferm*, 15(4), 679-84
- Casarin, S. T., Porto, A. R., Gabatz, R. I.B., Bonow, C. A., Ribeiro, J. P., & Mota, M. S. (2010) Tipos de revisão de literatura: considerações das editoras do Journal of Nursing and Health. *J. nurs. Health*. 10, 1-7.
- Cruz, J. M., Hughes, C., Quilty, B., Montagnolli, R. N., & Bidoia, E. D. (2018). Agricultural Feedstock Supplemented with Manganese for Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis*. *Waste and Biomass Valorization*, 9(4), 613–618. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0019-6>
- 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. <https://doi.org/10.3303/CET1543047>
- Faria, A. F., Teodoro-Martinez, D. S., de Oliveira Barbosa, G. N., Gontijo Vaz, B., Serrano Silva, Í., Garcia, J. S., Tótola, M. R., Eberlin, M. N., Grossman, M., Alves, O. L., & Regina Durrant, L. (2011). Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. *Process Biochemistry*, 46(10), 1951–1957. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.07.001>
- Fernandes, P. L., Rodrigues, E. M., Paiva, F. R., Ayupe, B. A. L., McInerney, M. J., & Tótola, M. R. (2016). Biosurfactant, solvents and polymer production

- by *Bacillus subtilis* RI4914 and their application for enhanced oil recovery. *Fuel*, 180, 551–557. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.04.080>
- França, Í. W. L., Lima, A. P., Lemos, J. A. M., Lemos, C. G. F., Melo, V. M. M., de Sant'ana, H. B., & Gonçalves, L. R. B. (2015). Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. *Catalysis Today*, 255, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2015.01.046>
- Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M., & Alexandridis, P. (2020). Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 275, 102061. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>
- Janek, T., Gudiña, E. J., Polomska, X., Biniarz, P., Jama, D., Rodrigues, L. R., Rymowicz, W., & Lazar, Z. (2021). Sustainable Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Using Crude Glycerol from Different Wastes. *Molecules*, 26(12), 3488. <https://doi.org/10.3390/molecules26123488>
- Louhasakul, Y., Cheirsilp, B., Intasit, R., Maneerat, S., & Saimmai, A. (2020). Enhanced valorization of industrial wastes for biodiesel feedstocks and biocatalyst by lipolytic oleaginous yeast and biosurfactant-producing bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 148(January), 104911. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.104911>
- Makkar, R. S., Cameotra, S. S., & Banat, I. M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, 1(1), 5. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-5>
- Malt, F. I. El., & Souza, C. B. de. (2019). Tecnologia sustentável na produção de biodiesel. *Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade*, 6(13), 385–392.
- Marchant, R., & Banat, I. M. (2012). Biosurfactants: A sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnology Letters*, 34(9), 1597–1605. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0956-x>
- Oliveira, D. W. F., Lima França, Í. W., Nogueira Félix, A. K., Lima Martins, J. J., Aparecida Giro, M. E., Melo, V. M. M., & Gonçalves, L. R. B. (2013). Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.06.011>
- Pereira, J. F. B., Gudiña, E. J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J. A., Coutinho, J. A. P., & Rodrigues, L. R. (2013). Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*, 111, 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.040>
- Rahmat, N., Abdullah, A. Z., & Mohamed, A. R. (2010). Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives : A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 987–1000. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.11.010>
- Santos, B. F., Ponezi, A. N., & Fileti, A. M. F. (2014). Strategy of using waste for biosurfactant production through fermentation by *Bacillus subtilis*. *Chemical Engineering Transactions*, 37(Ucp 0995), 727–732. <https://doi.org/10.3303/CET1437122>
- Santos, B. F., Ponezi, A. N., & Fileti, A. M. F. (2016). Strategy for waste management in the production and application of biosurfactant through surface response methodology. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 18(3), 787–795. <https://doi.org/10.1007/s10098-015-1052-4>
- Secato, J. F. F., dos Santos, B. F., Ponezi, A. N., & Tambourgi, E. B. (2017). Optimization Techniques and Development of Neural Models Applied in Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis*; Using Alternative Substrates. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 08(10), 343–360. <https://doi.org/10.4236/abb.2017.810025>
- Silva, S. N. R. L. (2009). Glicerol como Substrato para a produção de biosurfactantes po *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Dissertação - Universidade Católica de Pernambuco, Recife.*, 135.
- Sousa, M., Dantas, I. T., Feitosa, F. X., Alencar, A. E. V., Soares, S. A., Melo, V. M. M., Gonçalves, L. R. B., & Sant'ana, H. B. (2014). Performance of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LAMI005 on the formation of oil / biosurfactant / water emulsion: study of the phase behaviour of emulsified systems. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31(3), 613–623. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20140313s00002766>
- Sousa, M., Melo, V. M. M., Rodrigues, S., Sant'ana, H. B., & Gonçalves, L. R. B. (2012). Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(6), 897–906. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0674-0>
- Tan, K. T., Lee, K. T., & Mohamed, A. R. (2010). Optimization of supercritical dimethyl carbonate (SCDMC) technology for the production of biodiesel and value-added glycerol carbonate. *Fuel*, 89(12), 3833–3839. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2010.07.010>
- Yuliani, H., Perdani, M. S., Savitri, I., Manurung, M., Sahlan, M., Wijanarko, A., & Hermansyah, H. (2018). Antimicrobial activity of biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* C19. *Energy Procedia*, 153, 274–278. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.10.043>
- Zhu, Z., Zhang, B., Chen, B., Cai, Q., & Lin, W. (2016). Biosurfactant Production by Marine-Originated Bacteria *Bacillus Subtilis* and Its Application for Crude Oil Removal. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(9), 328. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3012-y>