

EKSTRAKSI LIPID DARI BIOMASSA *Synechococcus* sp. DENGAN METODE OSMOTIC SHOCK

Lipid Extraction of Synechococcus sp. Biomass Using Osmotic Shock

Ahmad Budi Junaidi¹, Zulfikurrahman¹, Abdullah¹ dan Gunawan²

¹Program Studi Kimia Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat
²Program Studi Biologi Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat
Jl. A. Yani Km 36 Banjarbaru, Kalimantan Selatan
e-mail: a_budi_j@yahoo.co.id

Abstrak

Telah dilakukan penelitian mengenai ekstraksi lipida dari biomassa mikroalga *Synechococcus* sp. dengan metode *osmotic shock*. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi optimum ekstraksi, produktivitas lipida, dan karakteristik lipida yang dihasilkan. *Osmotic agent* yang digunakan dalam penelitian ini adalah NaCl, KCl, CH₃COONa, dan glukosa dengan variasi konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 g/L. Hasil ekstraksidan produktivitas lipida tertinggi dari *Synechococcus* sp. diperoleh menggunakan *osmotic agent* CH₃COONa pada konsentrasi 250 g/L dengan nilai berturut-turut 12,19% dan 95,42 mg/L/hari. Karakterisasi produk esterifikasi menggunakan GCMS diperoleh lima senyawa metil ester utama yang menyusun produk hasil esterifikasi yaitu metil palmitat, metil linoleat, metil stearat, metil elaidat dan metil oleat. Berdasarkan data-data yang diperoleh, mikroalga *Synechococcus* sp. potensial untuk dikembangkan sebagai bahan baku biodiesel.

Kata kunci: *osmotic shock*, *osmotic agent*, lipid, mikroalga, *Synechococcus* sp.

Abstract

Lipid extraction of Synechococcus sp. biomass using osmotic shock method has been performed. The aims of this research are to obtain the optimum extraction conditions, lipid productivity, and lipid characteristics. In this research NaCl, KCl, CH₃COONa and glucose with concentration of 50; 100; 150; 200; and 250 g/L were used as osmotic agents. The highest yield and lipid productivity were 12.19% and 95.42 mg/L/day, respectively when CH₃COONa (250 g/L) was used as the osmotic agent. The characterization of lipid after esterification with GCMS obtained five main methyl ester compounds that were methyl palmitic, methyl linoleate, methyl stearate, methyl elaidic, and methyl oleate. Based on the characterization results, it is concluded that the microalgae Synechococcus sp. is potential to develop as raw material of biodiesel.

Keywords: *osmotic shock*, *osmotic agents*, lipid, microalgae, *Synechococcus* sp.

PENDAHULUAN

Energi alternatif yang sangat potensial menggantikan sumber energi fosil adalah biofuel. Salah satu produk biofuel yang sangat penting saat ini adalah biodiesel yang digunakan untuk menggantikan minyak diesel sebagai bahan bakar mesin dengan sedikit atau bahkan tanpa modifikasi. Pemilihan sumber bahan baku produksi biodiesel yang tepat merupakan suatu hal yang

sangat penting. Mikroalga merupakan salah satu organisme yang dapat dinilai ideal dan potensial untuk dijadikan sebagai bahan baku produksi biodiesel (Li, *et al.*, 2008 ; Raja, *et al.*, 2008; Gouveia & Oliveira, 2009).

Kandungan lipida dalam biomassa mikroalga kering spesies tertentu dapat mencapai di atas 50% dengan pertumbuhan yang sangat cepat (Hossain, *et al.*, 2008 ; Hu, *et al.*, 2008 ;

Massinggil, 2009). Proses pembiakan mikroalga hanya membutuhkan waktu 10 hari untuk siap dipanen sehingga secara matematis produktivitasnya mencapai (120.000 kg biodiesel/Ha tahun) lebih dari 20 kali lipat produktivitas minyak sawit (5.800 kg biodiesel/Ha tahun) dan 80 kali lipat dibandingkan minyak jarak (1.500 kg/biodiesel/Ha tahun) (Teresa, *et al*, 2010).

Tahapan penting dalam pemanfaatan lipida mikroalga sebagai bahan baku produksi biodiesel adalah ekstraksi lipida. Kandungan air mikroalga yang tinggi (70-90%) menyebabkan perlunya proses pengeringan biomassa agar lipida yang terkandung pada mikroalga dapat diekstrak secara optimal. Proses pengeringan membutuhkan sejumlah besar energi dan proses ini berpotensi merusak lipida yang terkandung pada mikroalga. Hal ini menjadi alasan bahwa metode ekstraksi lipida menggunakan biomassa mikroalga basah secara langsung merupakan solusi yang menarik untuk dikembangkan (Yoo *et al.*, 2012).

Lipida pada mikroalga dapat diekstrak secara langsung tanpa proses pengeringan dengan cara menghancurkan sel mikroalga tersebut (*cell disruption method*). Salah satu metode *celldisruption* yang dikenal adalah metode *osmotic shock* (Mercer & Armenta, 2012). Metode *osmotic shock* merupakan metode baru yang dinilai cocok untuk diterapkan pada ekstraksi lipid dari mikroalga dengan hasil

ekstraksi mencapai 90%. Hasil penelitian Yoo *et al.* (2012) tentang penerapan metode *osmotic shock* pada ekstraksi lipida dari biomassa *Chlamydomonas reinhardtii* basa terbukti efektif meningkatkan hasil ekstraksi lipida sampai 2 kali lipat dibandingkan dengan ekstraksi pelarut biasa.

Berdasarkan hasil penelitian Rachmaniah *et al.* (2010) dan Yoo *et al.* (2012) diketahui bahwa penggunaan *osmotic agent* yang berbeda jenis dan konsentrasinya akan diperoleh hasil ekstraksi lipida yang berbeda pula. Berdasarkan hal tersebut, maka muncul permasalahan mengenai jenis dan konsentrasi *osmotic agent* yang optimal untuk ekstraksi lipida dari biomassa mikroalga basah dengan metode *osmotic shock*.

Penelitian ini mengkaji pengaruh jenis *osmotic shock* NaCl, KCl, CH₃COONa dan glukosa dengan variasi konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 g/L pada ekstraksi lipid menggunakan biomassa mikroalga *Synechococcus* sp. basah. Kajian mengenai produktivitas dan karakteristik lipida *Synechococcus* sp. yang dihasilkan akan menentukan potensi lipida *Synechococcus* sp. sebagai bahan baku biodiesel.

METODE PENELITIAN

Pembuatan Media BG 11

Pembuatan media BG 11 dengan komposisi bahan makronutrien dan

mikronutrien diadopsi dari Stanier *et al.* (1971).

Inokulasi

Sebanyak 1 mL bibit *Synechococcus* sp. dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 100 mL media BG 11 (Stanier *et al.*, 1971; Reddy, 2002) lalu ditentukan kepadatan sel awalnya. Pertumbuhan sel yang mencapai 50.000 sel/mL pada hari ke-2 digunakan untuk analisis pertumbuhan 14 hari berdasarkan perhitungan kepadatan sel dan kadar klorofil *a* (Setiawati, 2009).

Analisis Pertumbuhan Sel

Analisis pertumbuhan berdasarkan jumlah sel dan kadar klorofil *a* dilakukan selama 14 hari. Kepadatan sel dihitung menggunakan *haemocytometer* dengan rumus berikut (Fachrullah, 2011):

$$\text{Kepadatan sel } \left(\frac{\text{sel}}{\text{mL}} \right) = N \times 10^4$$

dimana N merupakan banyaknya sel.

Sedangkan metode penentuan konsentrasi klorofil *a* dimodifikasi dari Dere *et al.* (1998) dan Henriques (2007) yaitu sebanyak 10,0 mL stok mikroalga yang telah dikultur dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Biomassa mikroalga kemudian ditambahkan 10,0 mL metanol lalu disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Klorofil total yang terlarut dalam metanol diukur serapannya pada panjang gelombang 652 dan 665 nm. Konsentrasi klorofil ($\mu\text{g/mL}$) dihitung berdasarkan rumus

$$\text{Chl } a = 16,29A_{665} - 8,54A_{652} \pm 0,03234$$

dimana : A_{652} dan A_{665} merupakan absorbansi pada $\lambda = 652$ dan 665 nm (Ritchie, 2008).

Ekstraksi lipida secara *osmotic shock*

Biomassa *Synechococcus* sp. basah sebanyak 10,0 g ditambahkan 50,0 mL larutan KCl untuk setiap variasi konsentrasi larutan yang telah ditentukan (50, 100, 150, 200, dan 250 g/L) dan 20,0 mL heksana. Proses ekstraksi dilakukan selama 24 jam disertai pengadukan. Lapisan heksana diambil lalu diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* sehingga diperoleh lipida mikroalga (Yoo *et al.*, 2012). Jumlah lipida dalam sampel *Synechococcus* sp. ditentukan dengan rumus:

$$\text{yield lipida (\%)} = \frac{A - B}{C} \times 100\%$$

dimana : A = berat labu + ekstrak (g)

B = berat labu kosong

C = berat kering sampel (g)

Ekstraksi juga dilakukan menggunakan NaCl, CH_3COONa dan glukosa dengan cara kerja yang sama seperti pada ekstraksi menggunakan KCl.

Ekstraksi lipida dengan metode Blight & Dyer dan metode sokhletasi

Ekstraksi lipid dengan metode Blight & Dyer dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 2,0 g biomassa mikroalga yang telah kering kemudian ditambahkan 10,0 mL metanol dan 5,0 mL kloroform. Campuran diaduk menggunakan *stirer* selama 24 jam kemudian ditambahkan kembali 5,0 mL

kloroform dan 5,0 mL akuades. Lapisan kloroform kemudian diuapkan sehingga diperoleh lipida.

Ekstraksi lipida dengan metode sokhletasi dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 2,0 g biomassa mikroalga kering. Proses ekstraksi dilakukan selama 4 jam. Lipida yang terekstrak dapat diambil dengan cara menguapkan heksana.

Pembuatan metil ester dengan metode esterifikasi

Sebanyak 2,0 g sampel lipida dimasukkan ke dalam labu didih, ditambahkan 5,0 mL asam sulfat 1% dalam metanol dan dididihkan pada kondensor refluks selama 1 jam. Setelah dingin, tambahkan 20,0 mL akuades dan 5,0 mL heksana. Metil ester kemudian diambil dengan cara menguapkan fraksi heksana.

Penentuan bilangan iod

Penentuan bilangan iod dilakukan berdasarkan metode SNI 01-3555-1998.

Penentuan bilangan asam

Penentuan bilangan asam dilakukan berdasarkan metode SNI 06-2388-2006.

Penentuan bilangan penyabunan

Penentuan bilangan penyabunan dilakukan berdasarkan metode SNI 01-3555-1998.

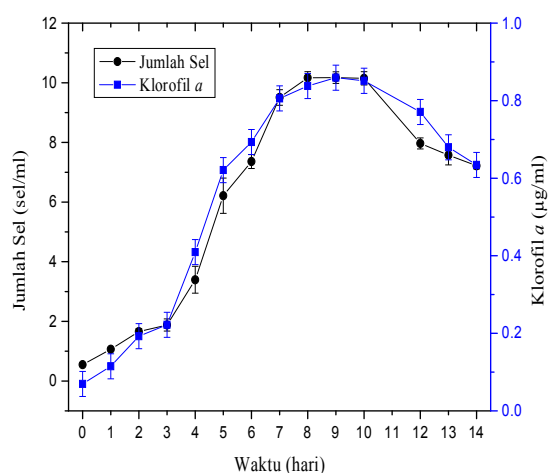
Penentuan komposisi asam lemak penyusun lipid

Penentuan komposisi asam lemak penyusun lipida *Syneochooccus* sp. dilakukan berdasarkan analisis GCMS

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan *Synechococcus* sp.

Pertumbuhan sel *Synechococcus* sp. berdasarkan jumlah sel dan kadar klorofil-a selama 14 hari (Gambar 1) menunjukkan bahwa peningkatan jumlah sel diikuti oleh peningkatan kadar klorofil-a.



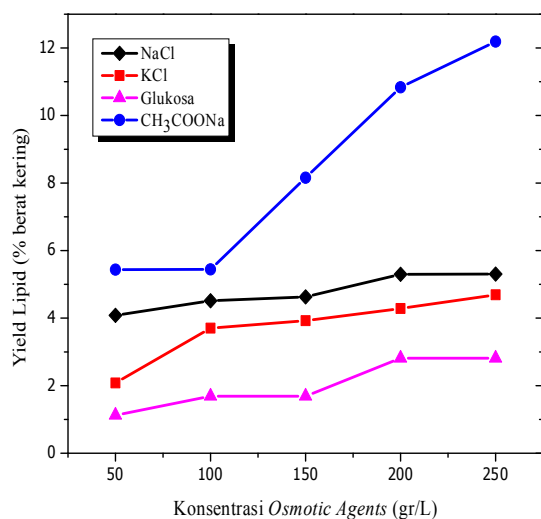
Gambar 1. Grafik pertumbuhan *Synechococcus* sp. berdasarkan jumlah sel dan klorofil-a

Fase eksponensial dimulai dari hari ke-3 sampai ke-7. Pertumbuhan sel dan klorofil-a *Synechococcus* sp. fase ini menunjukkan *Synechococcus* sp. telah mampu beradaptasi dengan lingkungan. Hari ke-7 sampai ke-10, pertumbuhan *Synechococcus* sp. memasuki fase stasioner. Setelah Hari ke-10 mulai terjadi fase kematian ditandai dengan penurunan jumlah sel dan klorofil-a. Fase ini disebabkan ketersediaan nutrisi telah jauh berkurang, juga dapat disebabkan oleh nutrisi yang teroksidasi dan sel-sel

mati yang dapat meracuni mikroalga itu sendiri.

Ekstraksi Lipida *Synechococcus*

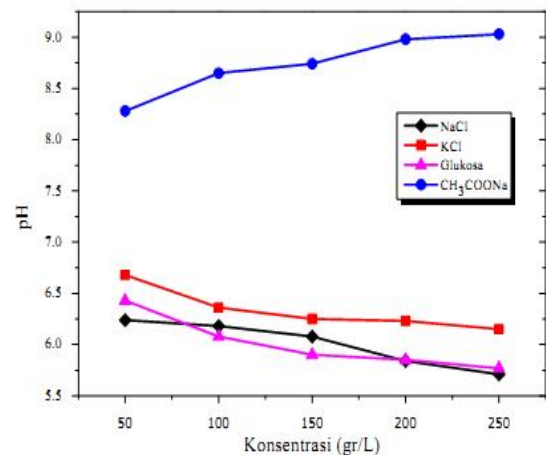
Ekstraksi lipida dilakukan dengan metode *osmotic shock* menggunakan biomassa dalam keadaan basah (kadar air $\geq 80\%$). *Osmotic agent* yang digunakan adalah glukosa, NaCl, KCl, dan CH_3COONa dengan variasi konsentrasi 50-250 g/L.



Gambar 2. Grafik hubungan antara *yield* lipida *Synechococcus* sp. dengan konsentrasi *osmotic agent*

Berdasarkan grafik pada Gambar 2 terlihat bahwa ekstraksi menggunakan menggunakan *yield* lipida maksimal yang diperoleh adalah sebesar 12,19% yaitu dengan menggunakan *osmotic agent* CH_3COONa 250 g/L. Menurut Yoo, *et al.* (2012) *osmotic agent* ionik lebih efektif mengekstraksi lipid dibandingkan *osmotic agent* non ionik. Hal ini karena larutan elektrolit mempunyai jumlah partikel yang lebih banyak daripada larutan non

elektrolit pada konsentrasi yang sama menyebabkan tekanan osmosis larutan elektrolit akan lebih besar jika dibandingkan dengan larutan non elektrolit (Dunlap *et al.*, 2007).



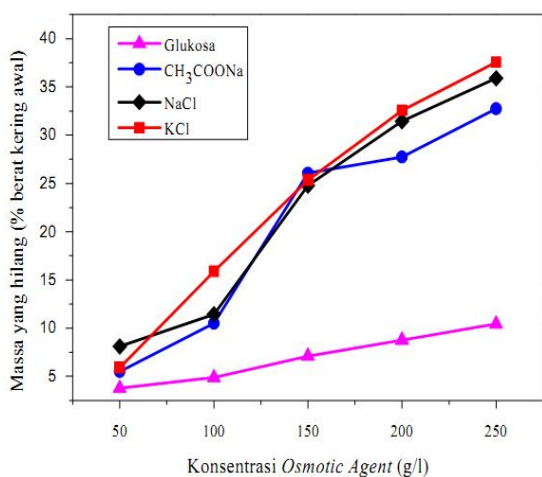
Gambar 3. Grafik hubungan konsentrasi *osmotic agent* dengan pH

Derajat keasaman (pH) larutan *osmotic agent* juga turut mempengaruhi perolehan kembali jumlah lipida (Nofrizal & Prashetya, 2012). Berdasarkan penelitian Rusmiyati (2000), kestabilan emulsi terjadi jika sistem emulsi berada pada pH 6-7. Gambar 3 menunjukkan bahwa larutan *osmotic agent* NaCl, KCl, dan glukosa pada konsentrasi 50-250 g/L berada pada kisaran pH 6-7. Hal ini menyebabkan emulsi yang terbentuk berada pada daerah pH kestabilan emulsi sehingga sulit untuk dihilangkan. Di samping itu, emulsi juga akan semakin stabil dengan meningkatnya konsentrasi. Namun, efek konsentrasi ini hanya terjadi pada *osmotic agent* yang bersifat ionik dan tidak berlaku pada glukosa.

Meskipun emulsi juga terbentuk pada saat ekstraksi menggunakan

CH_3COONa , namun emulsi ini tidak stabil dan dengan mudah dihilangkan hanya dengan sentrifugasi. Hal ini disebabkan karena pH larutan CH_3COONa pada konsentrasi 50-250 g/L berada pada kisaran 8-9 dimana pH tersebut bukan merupakan pH kestabilan emulsi. Efek konsentrasi juga tidak terlalu berpengaruh pada proses ekstraksi menggunakan CH_3COONa karena CH_3COONa secara teori merupakan garam yang berasal dari asam lemah dan basa kuat.

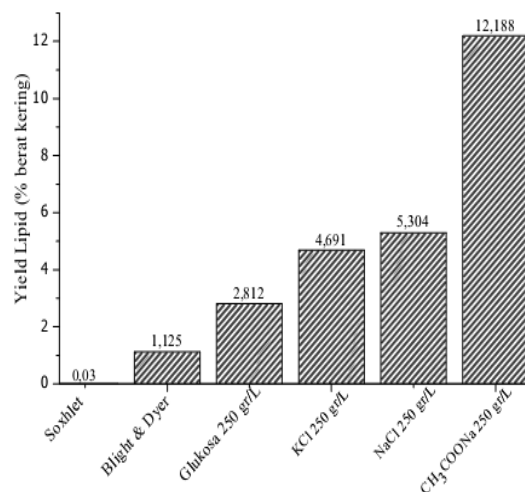
Gambar 4 menunjukkan bahwa terjadi pengurangan berat biomassa setelah ekstraksi baik menggunakan *osmotic agent* NaCl, KCl, CH_3COONa maupun glukosa. Pengurangan massa setelah ekstraksi menandakan bahwa sel telah pecah dan komponen di dalam sel keluar. Hal ini menandakan bahwa tiap *osmotic agent* berhasil merusak sel *Synechococcus* sp. dengan tingkat yang hampir sama, kecuali glukosa yang merupakan *osmotic agent* non ionik.



Gambar 4. Grafik pengurangan berat biomassa mikroalga setelah diekstraksi dengan *osmotic agents*

Perbandingan Metode *Osmotic Shock* dengan Metode Ekstraksi Lain

Gambar 5 menunjukkan bahwa metode sokhletasi dan Blight & Dyer kurang baik untuk ekstraksi lipid menggunakan biomassa basah.



Gambar 5. Yield lipida *Synechococcus* sp. yang dihasilkan dari beberapa metode ekstraksi

Pelarut organik seperti heksana dan kloroform bahkan tidak larut dalam air sehingga kontak antara biomassa dan pelarut yang bertindak sebagai pengekstrak lipida akan terhalangi kemampuan ekstraksinya. Akibatnya, lipida yang terekstrak pun menjadi rendah.

Penentuan produktivitas biomassa dan lipid *Synechococcus* sp.

Penentuan produktivitas biomassa dan lipida bertujuan untuk melihat seberapa besar potensi *Synechococcus* sp. dalam menghasilkan biomassa dan lipida per satuan waktu. Berdasarkan data yang diperoleh, didapatkan nilai produktivitas biomassa *Synechococcus* sp. kering sebesar 0,79 g/L/hari dan

produktivitas lipid yaitu 95,42 mg/L/hari. Meskipun *Synechococcus* sp. dapat digolongkan sebagai mikroalga yang memiliki kandungan lipida rendah, namun *Synechococcus* sp. memiliki produktivitas lipid yang cukup tinggi dikarenakan produktivitas biomasnya yang tinggi.

Karakteristik Lipida dan Metil Ester *Synechococcus* sp.

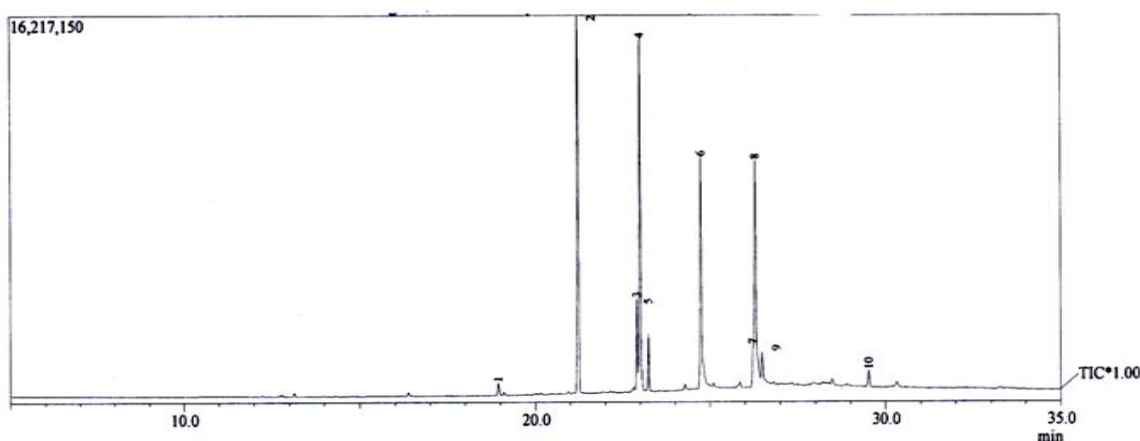
Karakterisasi terhadap lipida dan produk esterifikasi yang dilakukan adalah bilangan asam, bilangan penyabunan dan bilangan iod serta karakterisasi GCMS untuk metil ester. Data hasil karakterisasi lipida dan produk esterifikasi lipida *Synechococcus* sp. dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik lipid dan metil ester *Synechococcus* sp.

Parameter	Lipid	Metil Ester
Bilangan asam (mg KOH/g)	1,96	0,67
Bil. penyabunan (mg KOH/g)	196,35	192,20
Bilangan iod (g I ₂ /100 g)	8,12	9,64

Bilangan penyabunan metil ester *Synechococcus* sp. lebih rendah daripada lipid. Hal ini mengindikasikan bahwa konversi lipida menjadi metil ester ternyata menurunkan bilangan penyabunan. Proses esterifikasi lipida menjadi metil ester juga menyebabkan penurunan bilangan asam karena asam lemak bebas yang terkandung dalam lipida telah berubah menjadi metil ester.

Lipida *Synechococcus* sp. dapat digolongkan sebagai *non drying oil* (tidak mudah menguap dan jika teroksidasi tidak akan mengering/mengental) karena memiliki bilangan iod di bawah 100 g I₂/100 (Ketaren, 2005). Kenaikan bilangan iod menjadi 9,64 terjadi setelah esterifikasi lipid. Hal ini mungkin disebabkan oleh keberadaan CO₂ pada saat reaksi terjadi sehingga iod tidak hanya bereaksi dengan ikatan rangkap pada produk hasil esterifikasi lipida *Synechococcus* sp. namun juga dengan ikatan rangkap pada CO₂.



Gambar 6. Kromatogram GC metil ester *Synechococcus* sp

Kromatogram GC produk esterifikasi lipida (Gambar 6) menunjukkan bahwa ada 6 puncak utama yang diduga sebagai senyawa metil ester, senyawa-senyawa tersebut diperkirakan adalah metil palmitat, metil linoleat, metil stearat, metil elaidat, dan metil oleat (Tabel 2). Senyawa metil ester yang terbentuk tersebut pada

dasarnya merupakan senyawa asam lemak penyusun lipida yang saat proses esterifikasi terkonversi menjadi metil ester, sehingga dapat dikatakan komposisi asam lemak yang menyusun lipida *Synechococcus* sp. adalah asam palmitat, asam linoleat, asam elaidat, asam stearat dan asam oleat.

Tabel 2. Senyawa metil ester hasil esterifikasi lipida *Synechococcus* sp.

Puncak	Waktu Retensi	Luas Area (%)	Dugaan Senyawa	Rumus Molekul
2	21,222	24,78	Metil Palmitat	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
3	22,906	5,67	Metil Linoleat	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
4	23,005	23,27	Metil Elaidat	C ₁₉ H ₃₆ O ₂
5	23,242	3,35	Metil Stearat	C ₁₉ H ₃₈ O ₂
6	24,746	17,95	Asam Stearat	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
8	26,296	18,19	Metil Oleat	C ₁₉ H ₃₆ O ₂
Total		100,00		

KESIMPULAN

Ekstraksi lipida dari biomassa *Synechococcus* sp. dengan *osmotic agent* CH₃COONa 250 g/L menghasilkan ekstraksi lipida maksimal sebesar 12,19% berat kering. Produktivitas lipida mikroalga *Synechococcus* sp. yang diperoleh sebesar 95,42 mg/L/hari. Bilangan iod lipida 8,12 g I₂/100 g, bilangan asam 1,96 mg KOH/g, dan bilangan penyabunan 196,35 mg KOH/g. dengan komposisi asam lemak utama penyusun lipid mikroalga *Synechococcus* sp. adalah asam palmitat, asam linoleat, asam elaidat, asam stearat dan asam oleat.

DAFTAR PUSTAKA

Dunlap, C.A., K.O. Evans, B. Theelen, T. Boekhout & D. Schisler, 2007, Osmotic shock Tolerance and Membrane Fluidity of Cold Adapted *Cryptococcus flavescens* OH182.9

Previously Reported as *C. Nodaensis* A Biocontrol Agent of Fusarium Head Blight, *FEMS Yeast Research*, **7**: 449-458.

Dere, S., T. Gunes & R. Sivaci, 1998, Spectrophotometric Determination of Chlorophyll *a*, *b* and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species using Different Solvents, *Turkish Journal of Botany*, **22**: 13-17.

Gouveia L, & Oliveira AC., 2009, Microalgae as A Raw Material For Biofuels Production, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **36**: 269-274

Henriques, M., A. Silva & J. Rocha, 2007, Extraction and Quantification of Pigments from A Marine Microalgae: A Simple and Reproducible Method, *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, **8**: 586-593.

Hossain ABMS, Salleh A, Boyce AN, Chowdhury P, & Naquiuddin M., 2008, Biodiesel Fuel Production From Algae As Renewable Energy,

- American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, **4**(3) : 250–254.
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, & Seibert M., 2008, Microalgae Triacylglycerols As Feedstocks For Biofuels Production: Perspectives And Advances, *The Plant Journal*, **54**: 621–639.
- Li Y, Horsman M, Wu N, Lan C.Q, and Dubois-Calero N., 2008, Biofuels From Microalgae, *Biotechnology Progress*, **24**(4): 815–820.
- Ketaren, S., 2005, *Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan*, UI-Press, Jakarta
- Massingil, M. J., 2009, *15 Years of Experience Producing Microalgae Feedstock and Resulting Co-Products*, Kent Bioenergy Corporation, San Diego.
- Nofrizal, A., & A. Prashetya, 2012, *Pengaruh Suhu dan Salinity terhadap Kestabilan Emulsi Minyak Mentah Indonesia*. Monograph (Technical Report). Departemen Teknik Kimia, Universitas Diponegoro.
- Rachmaniah, O.R.D., Setyarini & L. Maulida, 2010, *Pemilihan Metode Ekstraksi Minyak Alga dari Chlorella sp. dan Prediksinya sebagai Biodiesel*. Seminar Teknik Kimia Soehadi Reksowardojo, Surabaya.
- Raja R, Hemaiswarya S, Kumar NA, Sridhar S. and Rengasamy R., 2008, A Perspective On The Biotechnological Potential of Microalgae, *Critical Reviews in Microbiology*, **34**(2):77–88
- Reddy, M.H., 2002, *Application of Algae Culture Technology for Carbon Dioxide & Flue Gas Emission Control*, Tesis, Arizona State Univ.
- Rusmiyati, 2000, *Pengaruh pH pada Kestabilan Emulsi Minyak Kedelai dan Air Menggunakan Fosfolipid sebagai Pengemulsi*, Skripsi Jurusan Kimia, UNDIP.
- Stanier, R.Y., R. Kusinawa, M. Mandel & G.C. Bazire, 1971, Purification and Properties of Unicellular Blue Green Algae (Order Chroococcales), *Bacteriological Reviews*, **35**: 171-205.
- Teressa, M., A. Martins & N. S. Caetano, 2010, Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A Review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**: 217-232.
- Yoo. G., W.K. Parka, C.W. Kima, Y.E. Choi & J.W. Yanga, 2012, Direct Lipid Extraction from Wet *Chlamydomonas reinhardtii* Biomass using Osmotic Shock, *Bioresource Technology*, **123**: 717-722.