

Estudio de las características morfológicas y fisiológicas de *Chlorella protothecoides* orientado hacia la producción de lípidos para biocombustible

Study of morphological and physiological characteristics of *Chlorella protothecoides* oriented to lipid production for biofuel

Gabriel Rodríguez-Castillo¹, Carla Amarelo-Santos²,
Maritza Guerrero-Barrantes³, Alberto Delgado dos Reis⁴

Fecha de recepción: 5 de noviembre 2015
Fecha de aprobación: 11 de marzo de 2016

Rodríguez-Castillo, G; Amarelo-Santos, C; Guerrero-Barrantes, M; Delgado dos Reis, A. Estudio de las características morfológicas y fisiológicas de *Chlorella protothecoides* orientado hacia la producción de lípidos para biocombustible. *Tecnología en Marcha*. Vol. 29, Número Especial Estudiantes 3. Pág 3-11.
DOI: 10.18845/tm.v29i6.2897

- 1 Ingeniero en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago. Costa Rica. Correo electrónico: gabrielest.rodriguez@gmail.com
- 2 PhD. Ingeniera Ambiental, investigadora de la Unidad de Bioenergía del Laboratorio Nacional de Energía y Geología, Lisboa, Portugal. Correo electrónico: carla.santos@lneg.pt
- 3 MSc. Bióloga con énfasis en Ecología, docente e investigadora de la Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago. Costa Rica. Correo electrónico: mguerrero@itcr.ac.cr
- 4 PhD. Ingeniero Químico, coordinador adjunto e investigador de la Unidad de Bioenergía del Laboratorio Nacional de Energía y Geología, Lisboa, Portugal. Correo electrónico: alberto.reis@lneg.pt



Palabras clave

Chlorella protothecoides; citometría de flujo multiparamétrica; autotrofia; heterotrofia; biocombustible.

Resumen

Las microalgas tienen un enorme potencial como fuente energética, pero el alto costo de la producción de biodiesel a gran escala, hace que este sistema aún no sea sustentable. Existen alternativas económicamente prometedoras que involucran cultivos auto- y heterotróficos con el fin de mejorar los rendimientos. Sin embargo, no todos los microorganismos tienen la capacidad que tiene *Chlorella protothecoides*, para crecer solo con una fuente de nitrógeno o de carbono orgánico. Con el fin de estudiar su morfología y fisiología, se cultivó *C. protothecoides* autotrófica y heterotróficamente en biorreactores de columna de burbujas con aireación constante. El monitoreo y control de las variables se realizó por medio de citometría de flujo multiparamétrica, utilizando Yoduro de Propidio y Rojo Nilo. Los resultados mostraron que las microalgas en sus fases de crecimiento presentan diferencias en tamaño, contenido celular y cantidad de lípidos, hasta una concentración máxima de 24,5% m/m de ácidos grasos y 4,5 g/l de biomasa; además, que en crecimiento heterotrófico las células tienden a perder sus cloroplastos y su capacidad fotosintética, aumentando la eficiencia en la producción de ácidos grasos.

Keywords

Chlorella protothecoides; multiparametric flow cytometry; autotrophic; heterotrophic; biofuel.

Abstract

The microalgae have an enormous potential as energetic source, though the massive production of biodiesel has really high costs, which make the system not sustentable. There exist low costs alternatives that involve auto- and heterotrophic crops to improve the performance; however, not all microorganisms have the same capacity that *Chlorella protothecoides* has to grow just with a nitrogen or carbon source. To study its morphology and physiology, *C. protothecoides* was cropped autotrophically and heterotrophically in glass bubble column bioreactors with constant airflow. The control of variables was done through multi-parametric flow cytometry using Propidium Iodide and Nile Red. The results showed that the microalgae in their growing phases have different sizes, cellular content and lipid concentration, with a maximum of 24.5% w/w of lipid acids and 4.5 g/l of biomass. There was also observed that in the heterotrophic growth, the cells lose their chloroplasts and their photosynthetic capacity, increasing the efficiency in the production of lipid acids.

Introducción

Las microalgas son consideradas biofábricas que convierten el dióxido de carbono y luz solar en biocombustibles, alimentos, piensos, biofertilizantes y bioactivos, potenciales. Estos organismos tienen también la capacidad de ser utilizados en servicios de biorremediación, fijación de nitrógeno y absorción de CO₂ (Chisti, 2007; Loera-Quezada & Olguín, 2010; Lafarga, 2012). Por esta razón, las microalgas son vistas como materia prima alternativa para la próxima generación de combustibles, que se acompañará de una mayor cantidad de subproductos y servicios con alto valor agregado (Chisti, 2007).

Las microalgas en situaciones de estrés provocadas por condiciones ambientales, tanto químicas como físicas, sintetizan y acumulan ácidos grasos. Los principales estímulos que afectan el crecimiento de estos microorganismos son la temperatura, la intensidad luminosa, la deficiencia de nutrientes (nitrógeno, fósforo, azufre y silicio), la salinidad, la concentración de CO₂ y el pH del medio de cultivo, de estos la deficiencia de nitrógeno es el principal factor que incide en el metabolismo de los lípidos (Loera-Quezada & Olguín, 2010). Santos *et al.* (2013) comprobaron que un aumento en la concentración de CO₂ en la entrada de aire de un cultivo autotrófico de *Chlorella protothecoides* incrementó la productividad de biomasa y lípidos en 94% y 87% respectivamente, en comparación con el control.

Una alternativa económicamente viable para la producción industrial de biocombustible a base de microalgas es utilizar un sistema de crecimiento auto- y heterotrófico, el cual permite aumentar la producción de biomasa y la acumulación de alta cantidad de lípidos (Miao & Wu, 2006). Investigaciones reportaron que *C. protothecoides* cultivada en un medio adicionado con glucosa y disminuido en nitrógeno inorgánico alcanzó un contenido de lípidos de 69,32%, más alto que en un medio autotrófico (Xiong *et al.*, 2010). Santos *et al.* (2011) utilizaron una conexión de CO₂ gaseoso de un cultivo heterotrófico de *C. protothecoides* a uno autotrófico y obtuvieron un aumento de biomasa del 30% y un aumento de lípidos del 100%, en comparación con los controles. Estos resultados permiten deducir que este sistema de crecimiento es uno de los más eficientes en la producción de biomasa y de ácidos grasos para biocombustible.

El crecimiento algal depende de factores intrínsecos como la proliferación, la viabilidad celular, la fase de crecimiento y la edad del cultivo (Arias *et al.*, 2013). El monitoreo de la concentración de biomasa es crucial durante el proceso bioquímico, ya que permite la obtención de los lípidos en una alta concentración y con el máximo rendimiento (Lopes da Silva *et al.*, 2004). Por ello, Lopes da Silva *et al.* (2009) validaron el uso de la citometría de flujo en un cultivo heterotrófico de *C. protothecoides* como instrumento para obtener información exacta y precisa sobre los estados fisiológicos de las células presentes en una población. Estos investigadores obtuvieron como resultado que existe una alta correlación entre la fluorescencia del colorante Rojo Nilo y el contenido total de lípidos.

La citometría de flujo mejora los alcances de las técnicas microbiológicas clásicas que controlan la viabilidad y la proliferación celular. Entre ellas, la densidad óptica, el peso seco y el recuento manual de las células o colonias dan información del crecimiento ligado con la división celular, pero no sobre el estado fisiológico individual de las células (Hewitt & Nebe-Von-Caron, 2001; Hewitt & Nebe-Von-Caron, 2004). La citometría, por su parte, permite conocer en detalle lo que ocurre en el cultivo celular *in situ*, muy cerca del tiempo real y con alto grado de resolución estadística (Elsey *et al.*, 2007). Esta técnica utiliza fluorocromos, los cuales facilitan el análisis de la viabilidad celular mediante la integridad de la membrana citoplasmática, como el Yoduro de Propidio (PI) (Lopes da Silva *et al.*, 2004). Además, por medio de la tinción fluorescente Rojo Nilo se puede cuantificar el contenido celular de lípidos *in situ* (Lopes da Silva *et al.*, 2012).

Estudios relacionados con el cultivo auto- y heterotrófico de *C. protothecoides* se han centrado en la manipulación de las variables, para mejorar las productividades y rendimientos de lípidos y biomasa. Sin embargo, no se conoce en detalle la fisiología de las células en el proceso de crecimiento y acumulación de lípidos, ni su relación con el tamaño y viabilidad celular. Es por ello que se determinó como objetivo de esta investigación estudiar las características morfológicas y fisiológicas de *C. protothecoides* cultivada en un medio autotrófico y heterotrófico en cascada para la producción de lípidos para biocombustible, mediante citometría de flujo.

Materiales y métodos

Este estudio se llevó a cabo en el Departamento de Bioenergía del Laboratorio Nacional de Energía y Geología (LNEG), en Lisboa, Portugal.

Se utilizó la microalga *Chlorella protothecoides* cepa B25 procedente de la Colección de Cultivos de Algas UTEX de la Universidad de Austin Texas, EE.UU. Los inóculos provenientes de un cultivo autotrófico crecieron en Medio de Cultivo Básico (MCB) con una entrada de aire de 1 L/min a una temperatura de 27 °C y luz constante.

Para establecer un cultivo microalgal heterotrófico, se inoculó un biorreactor de columna de burbujas con 100 ml de la microalga *C. protothecoides* y 1 L de medio de cultivo compuesto de 20 g/L de dextrosa monohidratada, 2 g/L de extracto de levadura y 100 ml de agua de mar filtrada, a un pH de 7,2. El crecimiento se llevó a cabo a una temperatura de 28±1 °C, una entrada de aire de 1 L/min y en oscuridad.

Para llevar a cabo el crecimiento autotrófico, se introdujo un biorreactor de columna de burbujas con 100 ml de microalgas y 1 L de medio de cultivo MCB compuesto de 1,25 g/L KH_2PO_4 ; 0,5 g/L NaHCO_3 ; 1,25 g/L KNO_3 ; 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,11 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,15 g/L $\text{FeEDTA} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 0,01 mg/L de vitamina B1 y 10 ml de solución de elementos traza, a un pH de 7,2. Estos últimos en una concentración por litro de 286 mg H_3BO_3 ; 154 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 22 mg ZnSO_4 ; 5 mg CuSO_4 ; 6 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 8 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Este tratamiento se cultivó en condiciones constantes de luminosidad, establecida a 2414,5 lux, a una temperatura de 28±1 °C y entrada de aire de 1 L/min.

Para monitorear el crecimiento celular en cada reactor, cada 24 horas se tomó una muestra de 5 ml de la cual se midieron el pH y la temperatura, y se observó al microscopio para valorar el crecimiento. La biomasa expresada en peso seco (g/l) se determinó por densidad óptica a 450 nm por duplicado, utilizando el espectrofotómetro de luz visible GENESYS 20 (Thermo Scientific, USA).

Con el fin de cuantificar *in vivo* el contenido de lípidos totales (neutrales y estructurales) y la viabilidad según el estado de la membrana celular, se tomaron muestras en cada uno de los modelos de crecimiento a los 3, 6 y 7 días y se analizaron por medio de un citómetro de flujo (Becton-Dickison Instruments™, FACS Calibur, Erembodegem, Belgium), equipado con un láser de argón de 488 nm. Para ello se utilizaron los colorantes Rojo de Nilo (Riedel de Haën, Buchs SG, Switzerland) para la cuantificación de lípidos, y Yoduro de Propidio (Invitrogen, Carlsbad, USA), para viabilidad celular, siguiendo el protocolo establecido por Lopes Da Silva *et al.* (2009). Además, para el análisis del tamaño y el contenido celular, se estudió la dispersión de la luz en los detectores FSC-H y SSC-H del citómetro.

Resultados y discusión

Los resultados de la comparación de las variables tomadas en el cultivo heterotrófico y en el autotrófico, respectivamente, demuestran que el primero superó en productividad al segundo, en biomasa, ácidos grasos y en tasa de crecimiento (cuadro 1, figura 1). Esto probablemente se debe a la abundancia de carbono orgánico que contenía el cultivo heterotrófico, lo que incentivó un estrés nutricional. Meng *et al.* (2009) explican que el metabolismo fotosintético propio de las microalgas transforma el nitrógeno, la luz solar y el dióxido de carbono, en azúcares, lípidos y proteínas. Sin embargo, aumenta la acumulación de lípidos cuando se agota un nutriente esencial del medio, por lo general el nitrógeno, y existe un exceso de carbono en forma de glucosa (Wu, 2006), situación que posiblemente ocurrió en el reactor heterotrófico y que provocó el aumento en ácidos grasos y biomasa en relación con el autotrófico.

Cuadro 1. Parámetros de cinética y rendimiento de *C. protothecoides* en dos sistemas diferentes de crecimiento después de 7 días de cultivo.

Reactor	Productividad biomasa $g\ l^{-1}h^{-1}$	Tasa de crecimiento h^{-1}	Ácidos grasos, % m/m	Productividad á. grasos $g\ l^{-1}h^{-1}$
Heterotrófico	0,59	0,02	24,5	0,14
Autotrófico	0,16	0,01	7,0	0,01

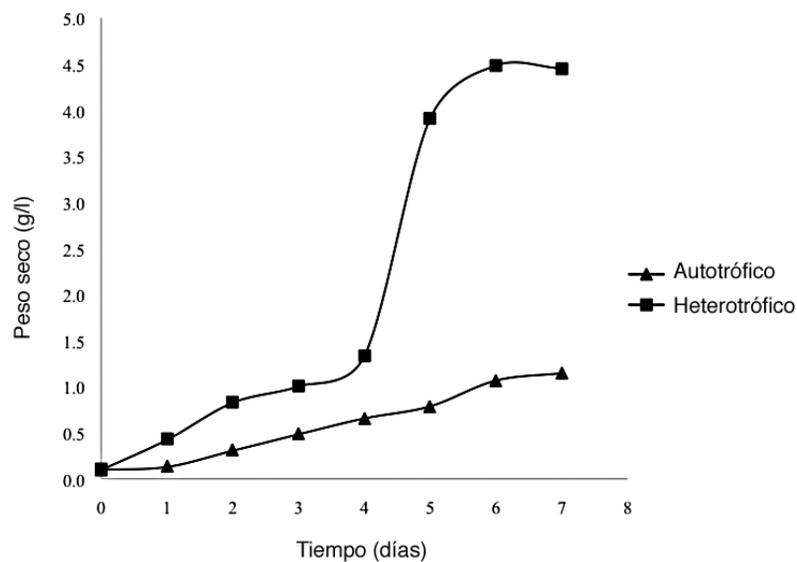


Figura 1. Curva de crecimiento de biomasa en un cultivo auto y heterotrófico de *C. protothecoides*

Los datos reportados del contenido de lípidos por citometría de flujo demuestran que en el reactor heterotrófico disminuyó la concentración de este metabolito del inicio al final de la fase estacionaria (días 5 y 7), mientras que en el reactor autotrófico fue aumentando gradualmente la concentración de lípidos en el tiempo, hasta llegar a un máximo en la fase estacionaria (cuadro 2). Esto indica que el contenido lipídico es mayor en la fase de crecimiento estacionario que en la fase exponencial, debido a que estos compuestos solo se acumulan cuando las células están bajo condiciones de estrés fisiológico. Li *et al.* (2008) reportan que generalmente el contenido de lípidos durante la fase exponencial de crecimiento es menor o igual al 15% en peso seco, y en crecimiento estacionario, por la falta de nitrógeno, podría aumentar hasta el 70%.

Los resultados del análisis de viabilidad celular por citometría de flujo señalan que el cultivo heterotrófico presentó el mayor porcentaje de células viables y el menor porcentaje de células no viables, en comparación con el cultivo autotrófico (cuadro 2), esto debido posiblemente a que en comportamiento autotróficos las microalgas se ven más afectadas por factores ambientales que en comportamiento heterotróficos. Vonshak & Torzillo (2004) señalan que el cultivo autotrófico limita su crecimiento según la intensidad lumínica y la concentración de CO_2 y nitrógeno presentes. A pesar de esto, ambos cultivos presentaron datos aceptables de viabilidad, sin que se evidenciaran efectos drásticos de las condiciones de cultivo sobre las células.

Cuadro 2. Porcentaje de células viables según integridad de la membrana celular y contenido de lípidos totales en un cultivo autotrófico y heterotrófico de *C. protothecoides*

Reactor	Días	Lípidos totales, %	Células viables, %	Células no viables, %
Heterotrófico	5	38,8	84,5	15,5
	6	32,5	93,8	6,2
	7	16,4	92,5	7,5
Autotrófico	3	6,5	78,1	21,9
	6	7,5	88,4	11,6
	7	8,5	89,7	10,3

Los resultados del análisis de la dispersión intrínseca de la luz mediante la citometría de flujo demuestran que las células tomadas a los días 5 y 7 de crecimiento, en el reactor heterotrófico, presentaban gran semejanza en el tamaño y contenido celular. No se observaron cambios importantes en estos parámetros, a pesar de la disminución en la cantidad total de lípidos determinada por fluorescencia (figura 2), esto debido a que ambas muestras se tomaron en la fase estacionaria. Según Tomaselli, (2004), la acumulación de lípidos intracelulares no es la única causa de cambio en el tamaño de las células; este también tiene que ver con la fase de división celular en que se encuentre el cultivo. En este reactor ambas muestras se encontraban en la fase estacionaria, donde hay mínima división celular.

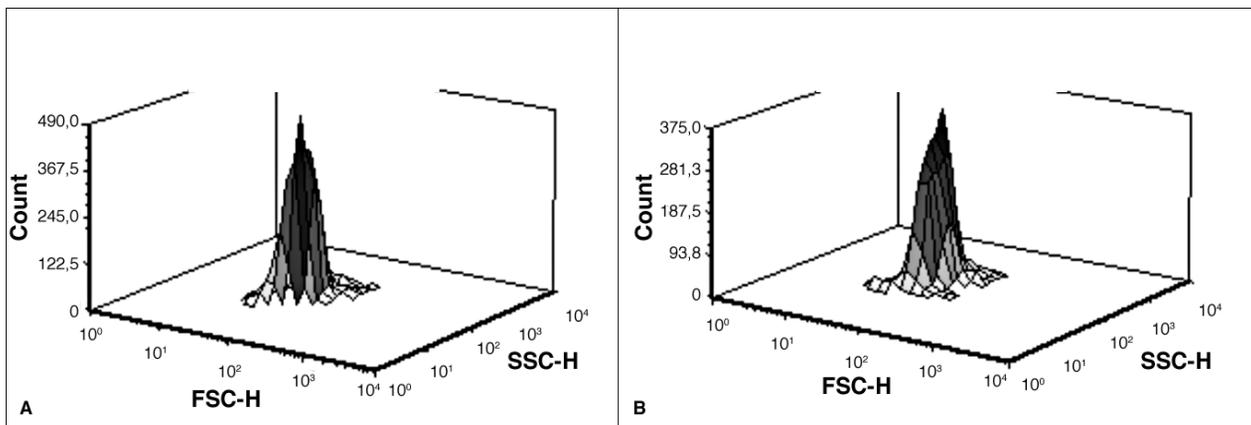


Figura 2. Análisis de la dispersión intrínseca de la luz por citometría de flujo multiparamétrica en dos diferentes muestras de cultivo heterotrófico de *C. protothecoides*, A) del día 5 y B) del día 7

En el reactor autotrófico, la dispersión intrínseca de la luz en las células tomadas el día 3 (fase exponencial), analizada por medio de citometría, mostró que la mayoría se aglomeraban en una subpoblación (a) en torno a una señal alta en SSC-H y FSC-H. Esto representa células más grandes y voluminosas que las de la subpoblación (b). Para el día 7 (fase estacionaria), se evidenció la presencia de dos grandes subpoblaciones, siendo la primera, (c), más densa, con

células menos grandes y menos voluminosas que la segunda, subpoblación (d) (figura 3). Esta diferencia de tamaños está relacionada con la fase de división celular en que las microalgas se encontraban, en el momento de la toma de la muestra. Según Tomaselli (2004), en la división celular la célula crece y todos los constituyentes celulares aumentan en número, de manera que cada célula hija reciba la misma información genética y una copia de todas las estructuras celulares (interfase), para luego realizar la división nuclear (mitosis). Por lo tanto, es probable que en crecimiento exponencial las células más abundantes correspondan a células madre en las primeras fases de división y, por el contrario, en la fase estacionaria la mayoría sean células más pequeñas y menos voluminosas, correspondiendo a una población con mayor cantidad de células hijas.

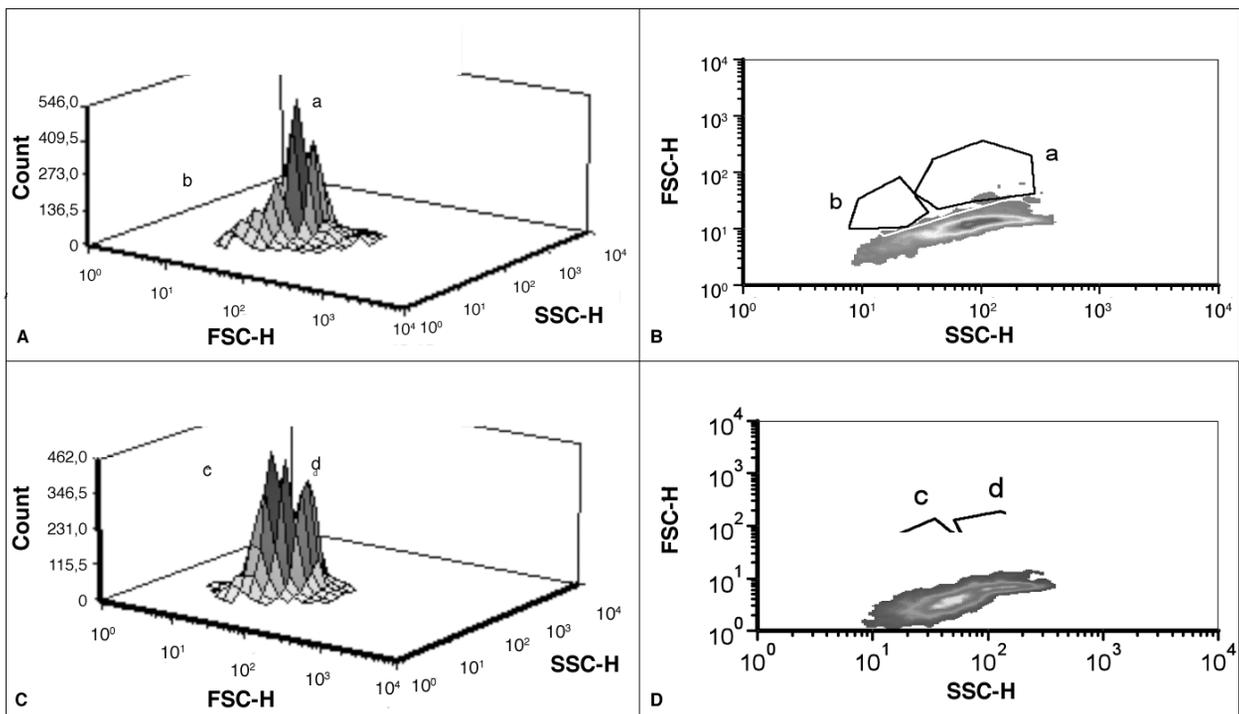


Figura 3. Análisis de la dispersión intrínseca de la luz por citometría de flujo multiparamétrica en dos diferentes muestras de cultivo autotrófico de *C. protothecoides*: A) y B) tomadas el día 3 de crecimiento, C) y D) el día 7

El monitoreo continuo del crecimiento celular en el reactor heterotrófico demostró, tanto macroscópica como microscópicamente, un cambio de color consistente en la pérdida de color verde conforme la microalga se adaptaba a las condiciones heterotróficas (figura 4). Este fenómeno se explica debido a la biodegradación de la clorofila, provocada por la falta de luz y de nitrógeno, condiciones ambientales esenciales para que se lleve a cabo la fotosíntesis. Xiong *et al.* (2010) realizaron un estudio por microscopía electrónica, donde demostraron que los cloroplastos eran claramente visibles en las células fotosintéticas, pero conforme pasaba el tiempo y las células se adecuaban al crecimiento heterotrófico, un número de gránulos de almidón se hacía visible. Las membranas de los tilacoides desaparecieron rápidamente en las 48 horas y en lugar de ello, el citoplasma se llenó totalmente de grandes gotas de lípidos. Al respecto, experimentos bioquímicos sugieren que la ruptura de la clorofila y la degeneración del cloroplasto se asocian con lipogénesis durante la etapa de fermentación.

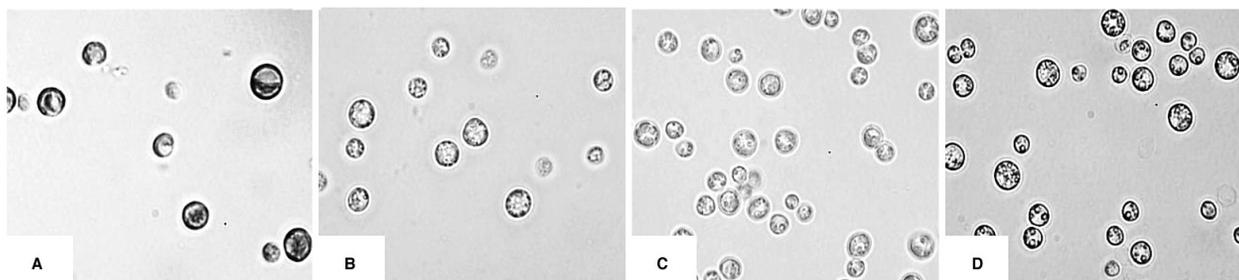


Figura 4. *C. protothecoides* en diferentes fases del crecimiento en el reactor heterotrófico, A) el día 7, B) el día 9, C) el día 11, D) el día 14. A: 1000X.

Los resultados de esta investigación indican que en células en crecimiento heterotrófico se obtiene mejor productividad en biomasa, en ácidos grasos, en porcentaje de lípidos, y una tasa de crecimiento y una viabilidad celular más altas, con respecto al crecimiento autotrófico; además, que las fases de crecimiento y los sistemas de cultivo se relacionan directamente con el estado morfológico y fisiológico de las microalgas, permitiendo o impidiendo su aumento de tamaño, la división celular y la acumulación de lípidos.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo para llevar a cabo esta investigación al Programa de Movilidad Estudiantil de la Rectoría del ITCR y al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), Red Temática P711RT0095 Sociedad Iberoamericana de Algología Aplicada-SI3A.

Bibliografía

- Arias, M., Martínez, A. & Cañizares, R. (2013). Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biológica Colombiana*, 18(1): 43-68.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25:294-306.
- Elsay, D.D., Jameson, B., Raleigh, M.L & Cooney (2007). Fluorescent measurements of microalgal neutral lipids. *Journal of Microbiological Methods*, 68: 639-642.
- Hewitt, C.J. & Nebe-von-Caron, G. (2001). An industrial application of multiparameter flow cytometry: Assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations. *Flow Cytometric Studies of Microbial Fermentations*, 44: 179-187.
- Hewitt, C.J. & Nebe-von-Caron, G. (2004). The application of multi-parameter flow cytometry to monitor individual microbial cell physiological state. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 89: 197-223.
- Lafarga, T. (2012). *Aspectos prácticos de la producción de microalgas: objetivos y necesidades*. (Tesis de Maestría) Universidad de Almería. Escuela Politécnica Superior.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N. & Lan, C. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 81(4): 629-636.
- Loera-Quezada, M. & Olguín, E. (2010). Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 1(1): 91-116.
- Lopes da Silva, T. & Reis, A. (2008). The use of multi-parameter flow cytometry to study the impact of n-dodecane additions to marine dinoflagellate microalga *Cryptocodinium cohnii* batch fermentations and DHA production. *Journal of the Society for Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(8): 875-87
- Lopes da Silva, T., Amarelo, C. & Reis, A. (2009). Multi-parameter flow cytometer as a tool to monitor heterotrophic microalgal batch fermentations for oil production towards biosiesel. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14: 330-337.

- Lopes da Silva, T., Reis, A., Hewitt, C. & Roseiro, J.C. (2004). Citometria de fluxo-funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Boletín de Biotecnología: Métodos em Biotecnología-Citometria de Fluxo II*, 77: 33-40.
- Lopes da Silva, T., Roseiro, J.C. & Reis, A. (2012). Applications and perspectives of multi-parameter flow cytometry to microbial biofuels production processes. *Trends in Biotechnology*, 30(4): 225-232.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q. & Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 34: 1-5.
- Miao, X.L. & Wu, Q.Y. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*. 97: 841-846.
- Santos, C.A., Caldeira, M.L., Lopes da Silva, T., Novais, J.M. & Reis, A. (2013) Enhanced lipidic algae biomass production using gas transfer from a fermentative *Rhodospiridium toruloides* culture to an autotrophic *Chlorella protothecoides* culture. *Bioresource Technology*, 138: 48-54.
- Santos, C.A., Ferreira, M.E., Lopes da Silva, L., Gouveia, L., Novais, J.M. & Reis, A. (2011). A symbiotic gas exchange between bioreactors enhances microalgal biomass and lipid productivities: taking advantage of complementary nutritional modes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38: 909-917.
- Tomaselli, L. (2004). The Microalgal Cell. In Amos Richmond (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Garsington Road: Iowa State Press, Blackwell Publishing (p. 3-39).
- Vonshak, A. & Torzillo, G. (2004). Environmental Stress Physiology. In Amos Richmond (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Garsington Road: Iowa State Press, Blackwell Publishing (p. 116-125).
- Wu, Q., Knowles, R. & Niven, D.F. (1995). Effect of ionophores on denitrification in *Flexibacter canadensis*. *Journal of Microbiological Methods*, 41: 227-234.
- Xiong, W., Gao, C., Yan, D., Wu, C. & Wu, Q. (2010). Double CO₂ fixation in photosynthesis-fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 101: 2282-2293.