

Master thesis report

submitted to obtain the degrees of

Master in Biology AgroSciences (BAS) of the University of Reims
Champagne-Ardenne

Master of Science in Engineering of Tallinn University of Technology

Master of Science (Technology) of Aalto University

Development of Protein Production Bioprocesses for *Komagataella phaffii*

Presented by: **ESQUIVEL ROMERO, Daniela Victoria**

Defended the: 25 /06 /25

Supervised by NAHKU, Ranno & SAQIB, Asfand Yar

at :

Center of Food and Fermentation Technologies (TFTAK), Mäealuse 2/4,
12618 Tallinn, Estonia

from: 11 /01/25 to 16 /07/25

Bioceb supervisors:

KONTTURI, Eero (Aalto University) and LAHTVEE, Pertri-Jaan (TalTech)

Confidentiality: Yes ☒ No ☐ Privacy expiration date: 16/06/30

Author Daniela Victoria Esquivel Romero

Title of thesis Development of Protein Production Bioprocesses for *Komagataella phaffii*

Summary (English):

The production of sweet proteins, such as brazzein, via precision fermentation in *Komagataella phaffii* presents a sustainable and scalable solution to the escalating global demand for non-caloric sugar alternatives. In this study, a systematic investigation of brazzein-producing *K. phaffii* strains (SBME113 and SBME205) was conducted to identify key parameters and physiological bottlenecks for industrial production on two carbon sources i.e. 1) glucose and 2) glycerol. A comparative analysis of growth kinetics, substrate consumption, and byproduct formation across three distinct cultivation modes: batch, chemostat, and an industrially established glycerol-methanol based fed-batch process. In batch, *K. phaffii* showed distinct metabolic pathways and demonstrated slightly higher maximum specific growth rate with significant byproduct formation on glucose ($\mu_{\max} \sim 0.28 \text{ h}^{-1}$ on glucose vs $\sim 0.22 \text{ h}^{-1}$ on glycerol). On the other hand, growth on glycerol on average resulted ~ 1.16 -fold higher biomass yield and ~ 1.8 -fold higher brazzein titres in chemostat studies (at dilution rates of 0.15 h^{-1} and 0.2 h^{-1}) while also being considerably cheaper and more sustainable than glucose. Subsequently, an industrial methanol-based fed-batch strategy yielded a brazzein titer of $244 \pm 28.47 \text{ mg/L}$ and a specific yield of $5.8 \pm 1.06 \text{ mg}$ per gram of dry weight but also revealed a critical limitation in the strain's sub-optimal methanol utilization rate. These findings highlight the necessity of developing advanced feeding strategies to manage methanol toxicity and improve process control for achieving industrially competitive brazzein titres.

Keywords Bioprocess, *Komagataella phaffii*, brazzein, batch, chemostat, fed-batch

Summary (Estonian):

Nõudlus madala kalorsusega suhkrualternatiivide järele maailma tulul on pidevalt kasvav. Magusate valkude, nagu *brazzein*, tootmine täppisfermentatsiooni teel *Komagataella phaffii*'s pakub jätkusuutlikku ja skaleeritavat alternatiivi. Käesolevas uuringus viidi läbi süstemaatiline uurimine *brazzein*'i tootvate *K. phaffii* tüvedele SBME113 ja SBME205, et tuvastada peamised parameetrid ja füsioloogilised kitsaskohad tööstuslikuks tootmiseks kahel süsinikuallikal: 1) glükoosil ja 2) glütseroolil. Võrdlev analüüs hõlmas kasvukineetikat, substraadi tarbimist ja kõrvalsaaduste moodustumist kolmes erinevas kultiveerimisrežiimis: annus-, kemostaat- ja tööstuslikult väljakujunenud glütserooli-metanooli baasil põhinevas pool-perioodilises protsessis. Annuskultiveerimisel saavutas *K. phaffii* glükoosi söötmel veidi kõrgema maksimaalse spetsiifilise kasvukiiruse ($\mu_{\max} \sim 0.28 \text{ h}^{-1}$ glükoosil vs $\sim 0.22 \text{ h}^{-1}$ glütseroolil) kuid sellega kaasnes ainevahetuse kõrvalsaaduste moodustumine. Kemostaat kultiveerimine läbivoolukiirusel 0.15 h^{-1} and 0.2 h^{-1} andis glütseroolil keskmiselt ~ 1.16 -korda suurema biomassi saagise ja ~ 1.8 -korda kõrgema brasseiini tiitri. Siin kohal on oluline mainida, et glütserool on odavam ja jätkusuutlikum kasvusubstraat kui glükoos. Järgmine samm oli tuvastada brasseiini maksimaalne tiiter kasutades poolperioodilist lähenemist, kus biomass kasvatatakse glütserooli söötmes ning brasseiini tootmine indutseeritakse metanooli söötme pideva lisamisega. Saavutati brasseiini tiiter $244 \pm 28.47 \text{ mg/L}$ ja spetsiifilise saagise $5.8 \pm 1.06 \text{ mg/g}$. Töö käigus tuvastati oluline kitsaskoht viimati mainitud protsessis. Nimelt üleminek glütserooli söötmelt metanooli söötmele on *K. phaffii* jaoks oluline metaboolne muutus. Täpne söötme lisamise kiiruse kontroll on tähtis, et vältida metanooli toksilist mõju ning kasvu hääbumist. Sensoripõhine tagasiside, et kontrollida metanooli söötme lisamise kiirust on vajalik täiendus tulevikus, mis loob eeldused saavutamaks robustset protsessi, mis töötab erinevatele *K. phaffii* tüvedele.

Keywords Bioprotsess, *Komagataella phaffii*, Brasseiini, Põhiprotsess, Kemostaat
