DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201605010

烟碱对东方伊萨酵母 HN-1 乙醇发酵的影响

王风芹[1],付晨青[1],谢瑶嫚[1],谢慧[1],任天宝[2],宋安东[1*]

1(河南农业大学 生命科学学院,农业部农业微生物酶工程重点实验室,河南 郑州,450002)
2(河南农业大学 烟草学院,河南 郑州,450002)

摘 要 以乙醇发酵工业菌株酒精酵母 1308 为对照,研究了烟碱对东方伊萨酵母 HN-1 乙醇发酵的影响,以期为烟秆等烟草废弃物的资源化利用提供宝贵的菌种资源。结果表明,烟碱对两菌种的菌体生长具有显著的抑制作用;当烟碱添加量为 0.1% ~0.5%时,东方伊萨酵母 HN-1 和酒精酵母 1308 的乙醇产量分别为 18.17 ~9.51 g/L 和 11.95 ~5.42 g/L,较对照分别下降了 20.81% ~58.55%和 40.42% ~72.94%,同时 1308 菌株的发酵周期较对照推迟 12 h;烟碱对 1308 菌株葡萄糖利用的抑制作用显著强于对 HN-1 的抑制作用。副产物结果分析表明,HN-1 菌株乙酸产量为 0.11 ~0.43 g/L,低于 1308 菌株的 0.20 ~0.59 g/L;甘油产量为 2.20 ~2.71 g/L,显著高于 1308 菌株的 1.48 ~2.33 g/L。东方伊萨酵母 HN-1 较酒精酵母 1308 更适合用于烟秆等烟草废弃物生物转化乙醇的研究与生产。

关键词 酵母菌株;乙醇发酵;烟碱胁迫;耐受性

生物乙醇由于其原料来源广泛、成本低廉、清洁环保和可再生的特点,被称为第一代可再生生物燃料,已作为汽油的部分替代品而被广泛应用[1]。选育抗逆能力强的微生物菌株用于乙醇生产可以简化工艺、节省成本,提高经济效益[2]。例如,可以利用耐高温酿酒酵母和克鲁维酵母,分别在 40 ℃和 45 ℃的温度下生产乙醇,以降低冷却成本[3-4];耐酸微生物运动发酵单胞菌的突变株在 pH 4.0 没灭菌的条件下可以利用厨房垃圾生产乙醇,最大程度地减少了细菌污染的风险,并降低了灭菌的成本[5];耐盐微生物东方伊萨酵母 MF-121 菌株在 50 g/L 的 Na_2SO_4 浓度下乙醇产量较高,可以降低脱盐成本和减少污染的可能性[6]。

我国烟草的种植面积和产量均居世界首位,每年会产生废弃烟秆约 150 万 t[7]。烟秆中纤维素含量高达 38.0% ~45.0%[8],可以作为较好的木质纤维素原料用于生物乙醇生产。而烟碱是烟草中最主要的生物碱,既是成瘾物质又是有毒物质[9]。已有研究结果表明,烟碱会对微生物生长繁殖产生一定的影响。孙世中等[10]在利用废弃烟叶进行燃料酒精发酵的研究中,发现除去烟碱的发酵效果比未除去烟碱的酒精得率高 28%,说明烟碱对酵母发酵有严重的抑制效应。张爱华等[11]开展了不同方法浸提烟草废料中烟碱的研究,并考察了浸提液的抑菌效果,实验结果表明,烟碱对细菌、霉菌有明显的抑制作用。因此,耐烟碱微生物菌株的选育是烟秆等烟草废弃物生产乙醇的关键环节之一。

课题组从烟叶腐解物中分离筛选到 1 株东方伊萨酵母 HN-1,该菌株最适的发酵温度范围为 38 ~45 ℃,具有较好的耐高温特性;利用玉米秸秆水解液进行发酵,乙醇产率为 0.468 g/g,达到了理论转化率的 91.6%[12]。本文以酒精酵母 1308 为对比菌株,研究了东方伊萨酵母 HN-1 对烟碱的耐受能力及其耐受特性,以期为烟秆等烟草废弃物资源化利用生产燃料乙醇提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 菌种

东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)HN-1,由河南农业大学微生物能源工程研究室分离保存;酒精酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)1308,由河南天冠集团提供。

1.2 培养基

1.2.1 菌种活化培养基

(1)东方伊萨酵母 HN-1:葡萄糖 20 g,酵母浸粉 10 g,蛋白胨 20 g,固体培养基加入琼脂粉 20 g,蒸馏水定容至 1 L,115 ℃灭菌 15 min。

第一作者:博士,副教授(宋安东教授为通讯作者,E-mail:Song1666@126.com)。

基金项目:河南省高校科技创新团队支持计划(15IRTSTHN014)
收稿日期:2015-12-09,改回日期:2016-01-13

(2)酒精酵母 1308:黄豆芽 200 g 加入 1 000 mL 蒸馏水中煮沸 30 min 后过滤,滤液中添加蔗糖 20 g,固体培养基加入琼脂粉 20 g,pH 5.0 ~ 5.5,115 ℃灭菌 15 min。

1.2.2 发酵培养基

葡萄糖乙醇发酵培养基:葡萄糖 50 g,酵母浸粉 3 g,蛋白胨 5 g,尿素 0.2 g,磷酸氢二铵 0.1 g,蒸馏水定容至 1 L,pH 5.5,115 ℃灭菌 15min。

1.3 菌种活化与扩大培养

(1)东方伊萨酵母 HN-1:取保藏菌种接种至斜面培养基,38 ℃培养 48 h 后,取 3 环斜面活化菌种至装有 50 mL 液体活化培养基的 250 mL 三角瓶中,38 ℃、180 r/min 摇床培养 10 h。

(2)酒精酵母 1308:取保藏菌种接种至斜面培养基,30 ℃培养 48 h 后,转接 3 环斜面活化菌种于相应液体活化培养基中,30 ℃、150 r/min 摇床培养 16 h。

1.4 菌种对烟碱的耐受试验

300 mL 三角瓶体系配制葡萄糖乙醇发酵培养基,按照 0.1%、0.2%、0.3% 和 0.5% 的浓度梯度将烟碱添加到发酵培养基中,并以未添加烟碱培养基作为对照,按体积分数 10% 的接种量接入 HN-1、1308 菌株的种子液,总装液量为 240 mL,分别于 38 ℃、30 ℃下静置发酵 108 h。每隔 12 h 取样测定菌体细胞干质量、乙醇、乙酸、甘油及葡萄糖浓度,研究不同浓度烟碱对 HN-1 和 1308 菌株菌体生长、底物消耗和产物生成的影响,以考察 HN-1 和 1308 菌株对烟碱的耐受性能。

1.5 测定方法

1.5.1 菌体细胞干质量的测定

细胞干质量以重量分析法进行分析。取干燥的 2 mL 离心管称重(G_1),然后将 2 mL 发酵液于 4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min,液体部分留样用于乙醇及葡萄糖浓度的测定,细胞沉淀用 0.85% NaCl 水洗 2 次后弃上清液,将细胞沉淀连同离心管置于烘箱中,60 ℃下干燥 10 h,取出置于干燥器内,冷却至室温后用分析天平称重(G_2)。由 G_1 和 G_2 可计算出菌体的干重 W(g/L)。

$$W = (G_2 - G_1)/0.002 \quad (1)$$

1.5.2 乙醇及葡萄糖浓度的测定

乙醇浓度使用气相色谱仪(Agilent technologies 7890A GC System)进行测定,色谱柱:HP-FFAP (30 m × 0.32 mm × 0.3 μm);检测器:FID(250 ℃);进样量 0.2 μL,进样器温度 200 ℃;氮气作为载气,载气流量 30 mL/min,分流比 1:30。

葡萄糖浓度使用液相色谱仪(Dionex P680)进行测定,色谱柱:离子排斥色谱柱 Aminex HPX-87H;检测器:示差折光检测器 RI 101(Shodex);流动相:5 mmol/L H_2SO_4,流速 0.6 mL/min;柱温 55 ℃;进样量 10 μL。

1.6 数据分析

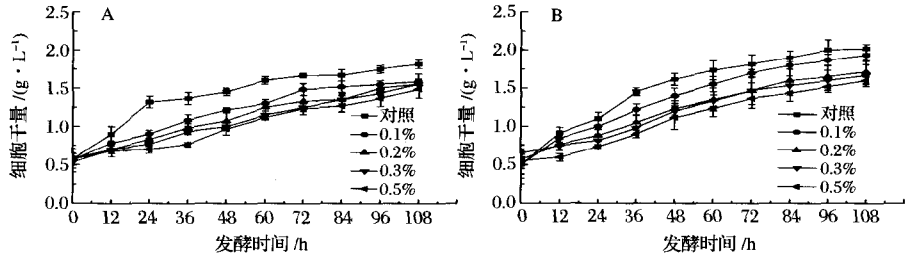
试验数据采用 Origin8.5 数据分析软件进行整理统计,并结合 SPSS19.0 对不同烟碱浓度下发酵菌株的细胞干重和乙醇产量进行了差异显著性分析。其中,乙醇产率计算,公式(2):

$$\text{乙醇产率}/(g \cdot g^{-1}) = \frac{\text{乙醇浓度} - \text{初始乙醇浓度}}{\text{初始葡萄糖浓度} - \text{残留葡萄糖浓度}} \quad (2)$$

2 结果与分析

2.1 烟碱胁迫对酵母菌株菌体生长的影响

由图 1 可以看出,烟碱对 2 株菌株的菌体生长都产生了不同程度的抑制作用。添加有 0.1%、0.2%、0.3% 和 0.5% 烟碱浓度的培养基与对照相比,在发酵初期即延滞期菌体的生长相对滞后,进入对数期菌体的生物量明显低于对照,并且随着烟碱浓度的升高而逐渐降低。烟碱在整个发酵周期中会显著抑制酵母菌菌体的生长($P < 0.01$)(图 1,表 1 和表 2)。



A - 东方伊萨酵母 HN-1 菌株;B - 酒精酵母 1308 菌株(下同)

图 1 不同烟碱浓度对酵母菌株菌体生长的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of nicotine on cell growth of yeast strains

2.2 烟碱胁迫对酵母菌株乙醇产量的影响

烟碱胁迫下酵母菌株的乙醇发酵情况如图2、表1和表2所示，添加烟碱可以显著降低乙醇的产量、产率和产生速率。在培养基中添加0.1%、0.2%、0.3%和0.5%烟碱后，东方伊萨酵母HN-1的乙醇产量分别为18.17、14.82、12.94和9.51 g/L，较对照(22.94 g/L)分别下降了20.81%、35.39%、43.61%和58.55%；酒精酵母1308的乙醇产量分别为11.95、10.31、8.29和5.42 g/L，较对照(20.05 g/L)分别下降了40.42%、48.57%、58.65%和72.94%(图3)。此外，烟碱的添加不仅降低了1308菌株乙醇发酵的产量，而且使发酵周期推迟了12 h。表明东方伊萨酵母HN-1对烟碱的耐受性高于酒精酵母1308。

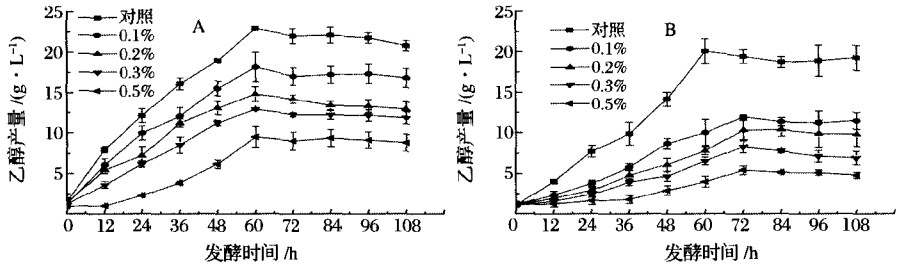


图2 不同烟碱浓度对酵母菌株乙醇产量的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of nicotine on ethanol production of yeast strains

表1 不同烟碱浓度下东方伊萨酵母HN-1菌株乙醇发酵参数

Table 1 Ethanol fermentation parameters of strain HN-1 with different concentrations of nicotine

烟碱浓度/%	菌体细胞干重/(g·L⁻¹)	乙醇产量/(g·L⁻¹)	乙醇产率/(g·g⁻¹)	乙醇产生速率/[g·(L·h)⁻¹]	葡萄糖消耗速率/[g·(L·h)⁻¹]
0	1.82±0.06aA	22.94±0.09aA	0.418	0.357	0.853
0.1	1.58±0.10bB	18.17±1.83bB	0.338	0.282	0.833
0.2	1.55±0.07bB	14.82±0.91cC	0.264	0.223	0.704
0.3	1.55±0.05bB	12.94±0.16cC	0.234	0.195	0.696
0.5	1.48±0.12bB	9.51±1.30dD	0.199	0.143	0.399

注：表中数值表示为平均值±标准误差。小写字母和大写字母分别表示0.05和0.01水平的差异显著性。

表2 不同烟碱浓度下酒精酵母1308菌株乙醇发酵参数

Table 2 Ethanol fermentation parameters of strain 1308 with different concentrations of nicotine

烟碱浓度/%	菌体细胞干重/(g·L⁻¹)	乙醇产量/(g·L⁻¹)	乙醇产率/(g·g⁻¹)	乙醇产生速率/[g·(L·h)⁻¹]	葡萄糖消耗速率/[g·(L·h)⁻¹]
0	2.02±0.06aA	20.05±1.51aA	0.382	0.317	0.592
0.1	1.93±0.08aAB	11.95±0.25bB	0.212	0.150	0.605
0.2	1.72±0.15bBC	10.31±1.21bBC	0.184	0.128	0.463
0.3	1.67±0.14bBC	8.29±0.72cC	0.145	0.101	0.468
0.5	1.60±0.15bC	5.43±0.55dD	0.099	0.060	0.403

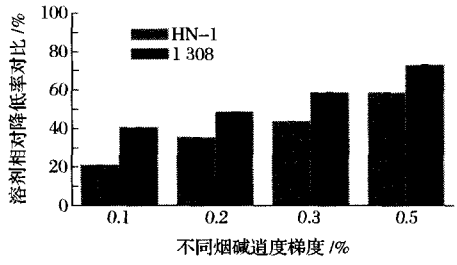


图3 HN-1和1308菌株乙醇产量相对降低率对比

Fig. 3 Comparison of relative decrease rate on ethanol production of strain HN-1 and 1308

2.3 烟碱胁迫下酵母菌株葡萄糖消耗情况

东方伊萨酵母HN-1和酒精酵母1308在发酵过程中葡萄糖的消耗情况如图4所示。未添加烟碱时，HN-1和1308菌株分别在发酵的48 h和84 h将葡萄糖彻底利用，烟碱的添加使葡萄糖利用速率减缓，其中添加0.1~0.3%烟碱，葡萄糖分别在两菌株发酵的60 h和96~108 h被彻底利用。添加更高浓度烟碱(0.5%)将严重抑制微生物对葡萄糖的利用速率，导致发酵结束后培养基中残糖浓度较高。

2.4 烟碱胁迫对发酵过程中副产物的影响

图5和图6为酵母菌株副产物乙酸和甘油的生成情况。烟碱添加量为0～0.5%时，东方伊萨酵母HN－1的乙酸产量为0.11～0.43 g/L，远低于相同条件下酒精酵母1308的乙酸产量（0.20～0.59 g/L）；然而其甘油产量为2.20～2.71 g/L，显著高于酒精酵母1308的甘油产量（1.48～2.33 g/L）。

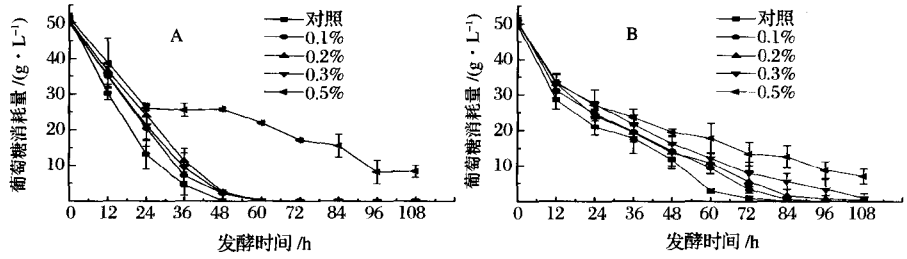


图4　不同烟碱浓度对酵母菌株葡萄糖消耗的影响

Fig. 4　Effect of different concentrations of nicotine on glucose consumption of yeast strains

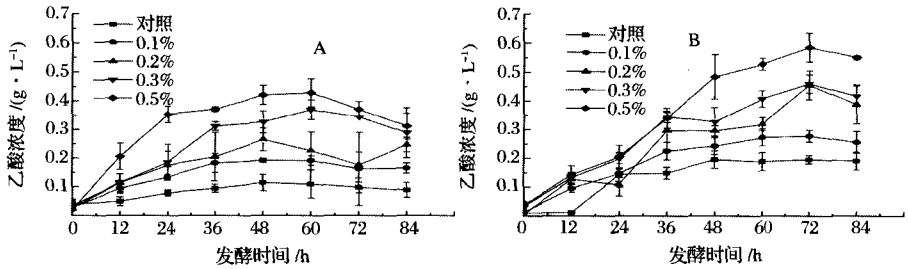


图5　不同烟碱浓度对酵母菌株发酵过程乙酸浓度的影响

Fig. 5　Effect of different concentrations of nicotine on acetic acid concentration of yeast strains during fermentation

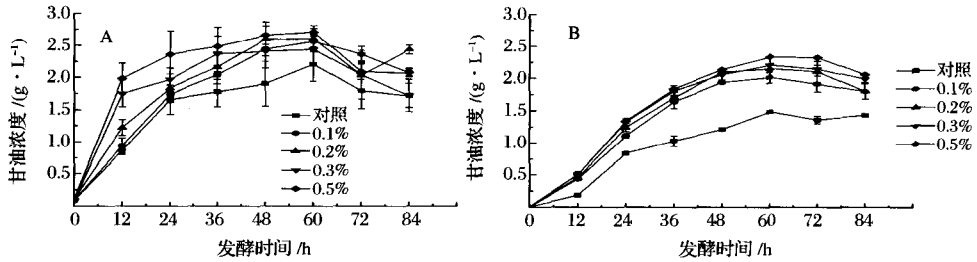


图6　不同烟碱浓度对酵母菌株发酵过程甘油浓度的影响

Fig. 6　Effect of different concentrations of nicotine on glycerol concentration of yeast strains during fermentation

3　讨论

微生物对不良环境的耐受性是工业菌种选育需要考虑的重要因素之一。获得耐性较好的工业菌株对于提高发酵效率，降低生产成本起着关键作用。课题组从烟叶腐解物中分离筛选到一株耐高温的乙醇发酵菌株东方伊萨酵母HN-1，该菌株最适发酵温度范围为38～45 ℃，对木质纤维素水解液有毒副产物甲酸钠、乙酸钠、糠醛、5-HMF和香草醛具有较强的耐受能力[13]，利用玉米秸秆水解液进行发酵，乙醇产率为0.468 g/g，达到了理论转化率的91.6%[12]。KWON等研究也发现，东方伊萨酵母IPE100不仅具有较好的耐高温特性[14]，且对有毒物质的最高耐受水平分别达到了糠醛5.56 g/L、5-羟甲基糠醛7.81 g/L和香草醛3.17 g/L，耐抑制浓度高于毕赤酵母和酿酒酵母[15]。可见，东方伊萨酵母对发酵过程中有毒物质的胁迫有较强的耐受性。本文以乙醇工业发酵菌株酒精酵母1308为对比菌株，研究了东方伊萨酵母HN-1对烟碱的耐受性能，以期为烟叶、烟秆等烟草生产过程中产生的废弃物为原料生产乙醇提供良好的菌种资源。结果表明，HN-1菌株耐烟碱性能相对较好，其菌体生长、乙醇发酵和葡萄糖消耗在相同的烟碱浓度下要明显优于1308菌株。本实验所用东方伊萨酵母HN-1分离自烟碱等有毒物质含量较

高的烟叶腐解物中，菌株可能在长期的进化适应过程中已经具有一定的适应性和耐性；而酒精酵母 1308 所处的环境不同于 HN-1 菌株，缺乏适应过程。因此，HN-1 菌株较 1308 菌株而言对烟碱的耐受能力更强，为烟草废弃物发酵生产乙醇提供了优异的菌种资源。

酵母细胞在不利的环境条件下，会合成一些重要的保护剂，来维持胁迫条件下细胞正常的膨压和代谢功能，并对细胞中的生物活性物质具有保护功能[16]。其中，甘油是酵母细胞最主要的渗透调节剂，对细胞有良好的非特异性保护作用[17]。本文研究结果表明，在相同的胁迫浓度下，HN-1 菌株的乙酸浓度低于 1308 菌株，而甘油浓度则相对较高。甘油积累较多使 HN-1 菌株能够有力抵御外界不良环境的影响，故在烟碱胁迫条件下，甘油合成能力强的 HN-1 菌株其生长和发酵情况受干扰程度更小。王继花等[18]也发现在正常培养条件下，细胞基本上不产生甘油，而盐胁迫条件下随着 NaCl 浓度的增加，胞内甘油含量有着明显的增加。另外，研究还发现烟碱胁迫下，微生物菌株生长和乙醇产生量受到显著抑制，而与对照组相比，0.1%、0.2% 和 0.3% 处理组的葡萄糖代谢水平却差异不大，这可能是由于胁迫条件下，菌株需要消耗更多的葡萄糖以产生能量或生物合成二糖（如海藻糖）、氨基酸等微生物逆境胁迫反应产物[19]。已有文献报道，酵母细胞内海藻糖的积累与细胞对外界不利环境的耐受性有密切关系[20-21]，李莉莉曾提出，热激胁迫下，酿酒酵母胁迫处理条件下海藻糖的积累明显高于对照[22]。由此推测，烟碱胁迫下，菌体可能会利用葡萄糖产生海藻糖以维持细胞的存活。对于这个问题，JENNINGS 等曾在研究中提出，真菌响应于盐胁迫产生的相容性溶质如甘油、甘露醇和脯氨酸，可以参与无效或底物循环，而且通过底物循环导致它们合成和分解的代谢途径诱导了能量泄漏。汉逊德巴利酵母在盐胁迫下的生长情况表明，随着胁迫程度的增加，能量泄漏越需要引起关注[23]。由此推测，烟碱胁迫下，菌体可能会利用葡萄糖产生其他副产物或进行能量的无效循环以维持细胞的存活。

4 结论

本文以乙醇发酵工业菌株酒精酵母 1308 为对照，研究了烟碱对东方伊萨酵母 HN-1 乙醇发酵的影响，结果表明，东方伊萨酵母 HN-1 具有较强的烟碱耐受能力，适合用于烟秆等烟草废弃物乙醇发酵的研究与生产。

参考文献

[1] YAN L, TANAKA S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2006, 69(6):627-642.

[2] 郭亭，梁达奉. 工业用糖蜜酿酒酵母菌株耐受性分析研究[J]. 微生物学通报，2008，2(2):188-192.

[3] SRIDHAR M, SREE N K, RAO L V. Effect of UV radiation on thermotolerance, ethanol tolerance and osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* VS 1 and VS 3 strains [J]. Bioresource technology, 2002, 83(3): 199-202.

[4] LIMTONG S, SRINGIEW C, YONGMANITCHAI W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(17):3 367-3 374.

[5] MA Hong-zhi, WANG Qun-hui, QIAN Da-yi, et al. The utilization of acid-tolerant bacteria on ethanol production from kitchen garbage[J]. Renewable Energy, 2009, 34(6):1 466-1 470.

[6] ISONO N, HAYAKAWA H, USAMI A, et al. A comparative study of ethanol production by *Issatchenkia orientalis* strains under stress conditions. [J]. Journal of Bioscience and bioengineering, 2012, 113(1):76-78.

[7] 刘超，翟欣，许自成，等. 关于烟秆资源化利用的研究进展[J]. 江西农业学报，2013，25(12)：116-119.

[8] 苏贤坤，张晓海，廖德智. 烟草综合利用现状及其前景[J]. 贵州农业科学，2006，34(5)：120-123.

[9] WANG Hai-hua, YIN Biao, PENG Xi-xu, et al. Biodegradation of nicotine by newly isolated *Pseudomonas* sp. CS3 and its metabolites[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112(2):258-268.

[10] 孙世中，高天荣，赵焱，等. 废弃烟叶燃料酒精发酵工艺探索[J]. 农业工程学报，2009，6(6):245-248.

[11] 张爱华，陈育如，许晓风，等. 烟草废料不同方法浸提烟碱的研究[J]. 生物加工过程，2004，2(4):54-56.

[12] 王风芹，汪媛媛，陶西，等. 耐高温东方伊萨酵母乙醇发酵特性[J]. 农业工程学报，2014，30(3):180-187.

[13] 王风芹，刘亚琼，张瑞，等. 木质纤维素水解液副产物对东方伊萨酵母乙醇发酵的影响[J]. 生物工程学报，2014，30(5):753-764.

[14] KWON Yong-jin, WANG Feng, LIU Chun-zhao. Deep-bed solid state fermentation of sweet sorghum stalk to ethanol by thermotolerant *Issatchenkia orientalis* IPE 100. [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(24):11 262-11 265.

[15] KWON Yong-jin, MA An-zhou, LI Qian, et al. Effect of lignocellulosic inhibitory compounds on growth and ethanol fermentation of newly-isolated thermotolerant *Issatchenkia orientalis*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(17):8 099 - 8 104.

[16] 孔庆学. 酿酒酵母遗传操作降低甘油合成提高乙醇产量的研究[D]. 天津:天津大学, 2007.

[17] BEROVIC M, PIVEC A, KOSMERL T, et al. Influence of heat shock on glycerol production in alcohol fermentation[J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2007, 103(2):135 - 139.

[18] 王继花. 盐胁迫下酿酒酵母生理生化特性的研究[D]. 大连:大连工业大学, 2008.

[19] 王欣. *Pseudomonas* sp. HF-1 响应尼古丁胁迫的代谢组学分析及其降解机制与污染修复[D]. 杭州:浙江大学, 2012.

[20] SHARMA S C. A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Fems Microbiology Letters, 1997, 152(1):11 - 15.

[21] MAHMUD S A, NAGAHISA K, HIRASAWA T, et al. Effect of trehalose accumulation on response to saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Yeast, 2009, 26(1):17 - 30.

[22] 李莉莉. 酿酒酵母耐性机理的代谢组学研究[D]. 广州:华南理工大学, 2010

[23] JENNINGS D H, BURKE R M. Compatible solutes-the mycological dimension and their role as physiological buffering agents[J]. New Phytologist, 1990, 116(2): 277 - 283.

Effect of nicotine on ethanol fermentation of *Issatchenkia orientalis* HN-1

WANG Feng-qin[1], FU Chen-qing[1], XIE Yao-huan[1], XIE Hui[1], REN Tian-bao[2], SONG An-dong[1*]

1(Key Laboratory of Enzyme Engineering of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

2(College of Tobacco Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

ABSTRACT The effects of nicotine on the ethanol fermentation by *Issatchenkia orientalis* HN-1 were studied using industrial strain *Saccharomyces cerevisiae* 1308 as control to provide valuable strain resources for the comprehensive utilization of tobacco stalk and other tobacco waste. The results indicated that nicotine could inhibit cell growth of these two strains significantly. After addition of nicotine from 0.1% to 0.5%, ethanol production of *Issatchenkia orientalis* HN-1 and *Saccharomyces cerevisiae* 1308 was 18.17 ~ 9.51 g/L and 11.95 ~ 5.42 g/L, respectively, which was decreased by 20.81% ~ 58.55% and 40.42% ~ 72.94% compared with the blank without addition of nicotine. Meanwhile, the fermentation period of strain 1308 postponed 12 h compared with the blank control, and the inhibition of nicotine on glucose consumption in this group was also stronger than that treated with strain HN-1. Analysis of byproducts showed that the yield of acetic acid of strain HN-1 was 0.11 ~ 0.43 g/L, which was lower than that of strain 1308 with the yield of 0.20 ~ 0.59 g/L. However, glycerol production of strain HN-1 was 2.20 ~ 2.71 g/L, with was significantly higher than that of strain 1308 with the production of 1.48 ~ 2.33 g/L. *Issatchenkia orientalis* HN-1 was more suitable for bioconversion of tobacco stalk and other tobacco waste into ethanol compared with *Saccharomyces cerevisiae* 1308.

Key words yeast strains; ethanol fermentation; nicotine stress; tolerance