

THIẾT LẬP QUY TRÌNH ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG ERGOSTEROL TỪ LOÀI ĐỊA Y - *C. faveomaculata* Makhija & Patw

Đến tòa soạn 10-03-2021

Trần Thị Huyền, Nguyễn Thị Nữ Trinh, Phan Thị Hoàng Anh,
Trần Đình Thắng, Nguyễn Ngọc Tuấn

Viện Công nghệ Sinh học-Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp TP Hồ Chí Minh

Chu Thị Minh Nguyệt

Bệnh viện Công an Thành phố Hồ Chí Minh

SUMMARY

ESTABLISHMENT OF QUALITATIVE AND QUANTITATIVE PROCEDURES FOR ERGOSTEROL FROM LICHENS - *C. faveomaculata* Makhija & Patw

This study focuses on the formulation of the extraction, isolation and purification ergosterol process from C. faveomaculata. The structure of ergosterol determined based on the data of spectrum (melting point, IR, MS, and NMR spectrum). Furthermore, a standard HPLC method for determining quality and quantities of ergosterol was established in this study. The results in this study showed that the prepared standard Ergosterol sample qualifies all evaluative standards. Moreover, at two independent laboratories up to ISO / GLP standards also revealed the standards are high quality, reliable, and eligible for registration of national standards.

Key words: *C. faveomaculata, ergosterol, steroid, HPLC.*

1. GIỚI THIỆU

Từ nhiều thập kỉ qua con người đã sử dụng nhiều thảo dược thay thế kháng sinh tự nhiên cho nhiều mục đích khác nhau. Bên cạnh các dược liệu được tách chiết từ các loại cây trồng, các loại vi nấm, địa y cũng đã tìm hiểu và ứng dụng nhiều trong điều trị bệnh. Các địa y đã được sử dụng để làm thuốc chữa bệnh như địa y *Lobaria pulmonaria* dùng chữa các bệnh về phổi hay *Parmelia sulcata* chữa các bệnh về não. Đặc biệt cùng các loài nấm và các nhóm vi sinh vật quang hợp như tảo, sự tồn tại của địa y đã hình thành một hệ sinh thái cộng sinh phát triển bền vững (1,2). Ngày nay với những công dụng đó, hơn 800 các hợp chất hóa học từ các địa y đã được chiết tách và xác định cấu trúc (3-5). Những hợp chất tự nhiên là những sản phẩm thứ cấp trong các quá trình biến dưỡng của địa y với phần lớn là các hợp chất

phenolic, depsides, depsidones, quinones, lactones, dibenzofurans, hay các dẫn xuất của pulvinic acid ((1,2,6).

Ergosterol được biết như là tiền chất của vitamin D2 hay còn gọi là lumisterol. Có rất nhiều loại hợp chất ergosterol, ví dụ như Ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol), các hợp chất này chỉ khác các ergosterol bởi nhóm 3 β -hydroxylated ergostane. Do đó, ergosterol được xác định như một phân tử sterol, chúng là phân tử kỵ nước và không tan trong nước, thường là trung tính. Ngoài ra, ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol) là một sterol được tìm thấy nhiều trong giới nấm (7-9). Ergosterol không có trong tế bào thực vật hoặc động vật. Nó là một thành phần của nấm men và nấm màng tế bào (10), có cùng chức năng như cholesterol trong tế bào ruồi dấm và nấm mốc (11,12). Ergosterol

đóng vai trò quan trọng trong màng tế bào và các thành phần tế bào khác, có liên kết chặt chẽ với tế bào chất nấm (13). Tuy nhiên, ergosterol không được tạo ra trong tất cả các loại nấm và hàm lượng của ergosterol là khác nhau giữa các loài tương ứng tùy thuộc vào chức năng trạng thái sinh lý của nấm (14-16), và hàm lượng của nó cao trong nấm trổng (602,1-678,6/100mg) cao hơn so với nấm hoang dã (296-489 mg/100g trọng lượng khô). Sự thay đổi về hàm lượng của ergosterol được thể hiện rõ hơn trong một nghiên cứu về tách chiết ergosterol từ nấm hương đã đưa ra nhận định rằng chất này không phải là sản phẩm của quá trình biến dưỡng thông thường mà được tổng hợp khi bổ sung hoa hạt cà phê vào môi trường nuôi cấy (17). Một trong những tính mới của chất ergosterol đã được xác định gần đây là kích ứng quá trình chết tự nhiên của tế bào trong các trường hợp bị viêm cấp hay hoại tử bởi sự liên kết của chúng với các protein dính trên màng từ các nghiên cứu trên các loài *Aspergillus fumigatus*, *Paracoccidioides brasiliensis*, hay *Candida albicans* (14).

Chính vì lợi ích được phát hiện từ cây địa y, nhiều công trình nghiên cứu liên quan đến việc tìm kiếm các hợp chất biến dưỡng mới của cây địa y đã và đang được tiếp tục nghiên cứu. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi đã lựa chọn một loài địa y (*C. faveomaculata*) Makhija & Patw để tiến hành nghiên cứu tách chiết, định tính và định lượng ergosterol, kết quả này sẽ là tiền đề cho việc xây dựng quy trình tiêu chuẩn trong phân tích hàm lượng ergosterol từ các nguồn mẫu chứa ergosterol khác nhau.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Địa y (*Cryptothecihza faveomaculata* Makhija & Patw) được thu trên cây cọ ở thành phố Vinh, tỉnh Nghệ An vào tháng 8/2016 và được TS Đỗ Ngọc Đài (Trường đại học kinh tế Nghệ An) định danh, mẫu được lưu giữ tại viện Hóa Sinh môi trường – Đại học Vinh. Mẫu tươi sau khi thu về được làm sạch, sấy khô ở nhiệt độ phòng trong khoảng 48 giờ. Sau đó chiết với các hệ dung môi thích hợp để thu các hỗn hợp

chất dùng cho nghiên cứu được nêu ở phần thực nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chiết xuất và phân tách phân đoạn ergosterol từ cây địa y (*C. faveomaculata*) Makhija & Patw

Địa y xay thành bột được trích kiệt bằng phương pháp ngâm dầm với dung môi ethanol 96% ở nhiệt độ phòng (1 ngày/lần x 5 lần). Lọc phần dịch trích, cô quay và thu hồi dung môi (17). Thực hiện nhiều lần, thu được cao toàn phần. Từ cao toàn phần ban đầu. Thăm dò trên sắc ký lớp mỏng để kiểm tra sự có mặt của chất cần phân lập, đồng thời tìm điều kiện để triển khai sắc ký cột cổ điển. Từ kết quả thăm dò, chọn ra hệ dung môi thích hợp và tiến hành phân lập trên cột sắc ký cổ điển để thu được các phân đoạn đơn giản chứa chất cần phân lập ().

2.2.2. Phân lập, định tính và tinh khiết dẫn xuất ergosterol từ cây địa y (*C. faveomaculata*) Makhija & Patw

Dùng phương pháp sắc ký cột với máy HPLC. Kiểm tra các phân đoạn thu được bằng sắc ký lớp mỏng. Tinh chế bằng phương pháp kết tinh, kết tủa.

2.2.3. Xác định cấu trúc

Sử dụng các phương pháp phổ nghiệm để xác định cấu trúc các hợp chất đã phân lập: UV-VIS, IR, MS, NMR

2.2.4. Xây dựng quy trình định lượng tiêu chuẩn phân tích hàm lượng ergosterol

Phương pháp HPLC, tính hàm lượng % nguyên trạng theo diện tích pic và nồng độ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Thăm định quy trình định lượng theo các nội dung sau:

Khảo sát tính tương thích hệ thống: Tiến hành sắc ký dung dịch mẫu thử 6 lần liên tiếp. Khảo sát các thông số: thời gian lưu, diện tích pic chính, hệ số kéo đuôi, độ phân giải và số đĩa lý thuyết. **Yêu cầu:** Độ lệch chuẩn RSD của thời gian lưu pic chính không quá 1 %. Độ lệch chuẩn RSD của diện tích pic chính không quá 2 %. Hệ số kéo đuôi: $0,8 \div 1,5$

Khảo sát tính đặc hiệu (tính chọn lọc): Đảm bảo kết quả xác định hàm lượng chất cần phân tích trong mẫu là chính xác, tránh ảnh hưởng của các thành phần có trong mẫu. Với kỹ thuật

HPLC sử dụng đầu dò PDA kiểm tra độ tinh khiết của pic. Tiến hành sắc ký lần lượt mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử. *Yêu cầu:* Thời gian lưu của pic chất cần định lượng trong mẫu thử phải tương đương với thời gian lưu của pic chất chuẩn tương ứng trong mẫu chuẩn. Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic tại thời gian lưu của chất khảo sát. Khi sử dụng chức năng kiểm tra độ tinh khiết của đầu dò PDA, pic của chất khảo sát không có các thành phần khác.

Khảo sát khoảng tuyến tính: Tiến hành sắc ký tối thiểu 5 mức nồng độ khác nhau, xác định diện tích pic ở từng nồng độ. Thiết lập phương trình hồi quy và vẽ đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic. Phương trình hồi quy: $y = ax + b$. Sử dụng trắc nghiệm để kiểm tra ý nghĩa của các hệ số trong phương trình

Khảo sát độ lặp lại: Mức độ sát gần giữa các kết quả thử riêng rẽ x_i với giá trị trung bình. Ảnh hưởng bởi sai số ngẫu nhiên. Tiến hành sắc ký tối thiểu 6 mẫu thử ở nồng độ định lượng. Tiến hành xử lý thống kê các số liệu, xác định độ lệch chuẩn tương đối. *Yêu cầu:* $RSD < 2 \%$.

Khảo sát độ đúng: Mức độ sát gần của các giá trị tìm thấy so với giá trị thực. Ảnh hưởng bởi sai số hệ thống. Sử dụng phương pháp dựa vào đường tuyến tính, với nồng độ khoảng 80 %, 100 %, 120 % so với nồng độ định lượng. Tiến hành sắc ký ở mỗi nồng độ trên với 3 mẫu khác nhau, tính % độ phục hồi ở từng nồng độ so với lý thuyết. *Yêu cầu:* Độ phục hồi ở từng nồng độ phải từ $98 \div 102 \%$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

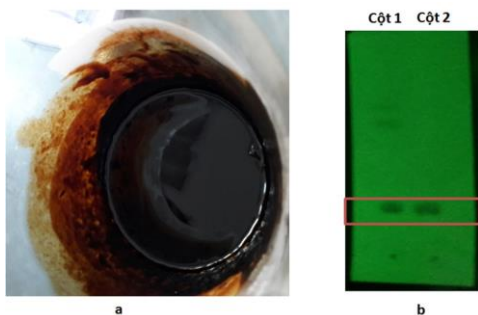
3.1. Chiết xuất, định tính và tinh khiết ergosterol từ cây địa y (*C. faveomaculata*) Makhija & Patw

Từ cao toàn phần ban đầu, thăm dò trên sắc ký lớp mỏng để kiểm tra sự có mặt của chất cần phân lập, đồng thời tìm điều kiện để triển khai sắc ký cột cổ điển. Từ kết quả thăm dò, chọn ra hệ dung môi thích hợp và tiến hành phân lập trên cột sắc ký cổ điển để thu được các phân đoạn đơn giản chứa chất cần phân lập. Kết quả phân tách được 300,35 g cao chiết, sau khi tiến hành sắc ký cột silica gel, giải li với hệ dung

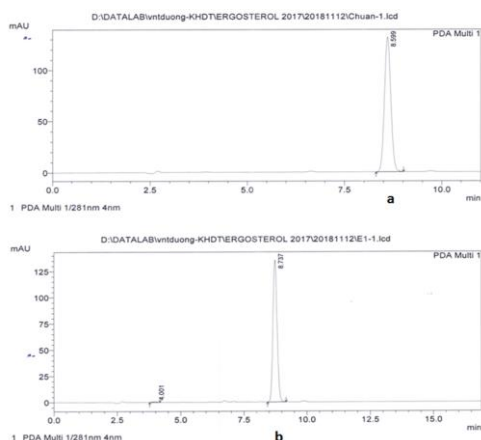
môi n-hexan : ethyl acetat (từ 50:1 đến 21: 1), đã tách được 4 phân đoạn cao, khảo sát bằng sắc ký lớp mỏng nhận thấy có vết giống với dung dịch đối chiếu ergosterol. Gộp dung dịch của 4 phân đoạn trên, cô quay, bay hơi đến cạn ở nhiệt độ phòng, thu được khối lượng bột thô (*) là 1,71 g. (cả quá trình phải tránh sáng). Chiết xuất và định tính ở hình 1. Dung dịch chuẩn ergosterol: 0,1 mg/ml trong acetonitril. Dung dịch thử: 0,1 mg/ml chất thu được trong acetonitril. Phát hiện: ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 254 nm hoặc dung dịch acid sulfuric 20 % trong ethanol. Quan sát sắc ký đồ mẫu thử và mẫu chuẩn, sơ bộ cho thấy mẫu thử có vết, khoảng cách di chuyển (R_f) và màu sắc giống với mẫu chuẩn Ergosterol.

Từ sắc ký đồ HPLC của dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Chất phân tách được chưa được tinh khiết còn lẫn nhiều tạp chất. Do đó phải tiến hành tinh chế chất thu được bằng phương pháp HPLC.

Mẫu với 1,01 g bột thô (*), thêm vào 100 ml methanol, lắc, siêu âm 10 phút. Chắt bỏ 100 ml dung dịch methanol. Lặp lại quá trình trên 3 lần nữa. Sau đó lọc lấy cặn, rửa cặn trên giấy lọc với 20 ml acetonitrile (5 lần). Thu được 974 mg bột tinh thể trắng đến trắng ngà. Tiến hành chạy HPLC với đầu dò PDA, thu được sắc ký đồ. Từ hình 2b nhận thấy chất phân tách được chưa tinh khiết còn lẫn nhiều tạp chất. Do đó phải tiến hành tinh chế chất thu được. Hình 2b: Chất Ergosterol sau tinh chế có độ tinh khiết gần như chuẩn Ergosterol. Hình 3: kiểm định chất lượng độ tinh khiết. Mẫu với 1,01 g bột thô (*), thêm vào 100 ml methanol, lắc, siêu âm 10 phút. Chắt bỏ 100 ml dung dịch methanol. Lặp lại quá trình trên 3 lần nữa. Sau đó lọc lấy cặn, rửa cặn trên giấy lọc với 20 ml acetonitrile (5 lần). Thu được 974 mg bột tinh thể trắng đến trắng ngà. Tiến hành chạy HPLC với đầu dò PDA, thu được sắc ký đồ. Từ hình 2b nhận thấy chất phân tách được chưa tinh khiết còn lẫn nhiều tạp chất. Do đó phải tiến hành tinh chế chất thu được. Hình 2b: Chất Ergosterol sau tinh chế có độ tinh khiết gần như chuẩn Ergosterol. Hình 3: kiểm định chất lượng độ tinh khiết.



Hình 1. Chiết xuất và định tính ergosterol. (a): cao chiết địa y bằng dung môi ethanol 96%. (b): Kết quả xác định hiện diện của ergosterol bằng sắc ký bản mỏng, cột 1: phân tách từ mẫu chuẩn ergosterol, cột 2: phân tách ergosterol từ mẫu cao chiết ethanol cây địa y *C. faveomaculata*) Makhija & Patw.



Hình 2. Định tính ergosterol được tách chiết từ cây chiết so với mẫu chất chuẩn ergosterol. địa y (*C. faveomaculata*) Makhija & Patw bằng phương pháp HPLC. (a): Định tính ergosterol từ mẫu chuẩn, (b): Định tính ergosterol từ cao chiết cây địa y

3.2. Xác định cấu trúc và kiểm định chất chuẩn

Phổ hồng ngoại IR của mẫu nghiên cứu có các pic hấp thụ đặc trưng ứng với phổ hồng ngoại (IR) của Ergosterol-USP/Lot IDG053. Phổ UV-VIS: Dung dịch chuẩn ergosterol và mẫu thử có nồng độ khoảng 0,01 mg/ml trong acetonitril. Định chính trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu ergosterol và dung dịch thử có phổ UV-VIS giống nhau về hình dạng và có cực đại hấp thụ $\lambda_{\max} = 281$ nm. Khối phổ MS theo hình 4. Phổ EI-MS: cho mảnh $[M-H]^-$ có số khối 397,29 tương ứng với công thức $[C_{28}H_{44}O - H]^-$ của Ergosterol ($M = 396,65$ g/mol). Phổ cộng hưởng từ MNR. Số liệu phổ

^{13}C -NMR của ergosterol và phổ 1H -NMR của hợp chất **ergosterol**. Từ kết quả của các phổ ^{13}C -NMR và 1H -NMR của hợp chất **ergosterol**, chúng tôi xây dựng cấu trúc đã cô lập được là **ergosterol**.

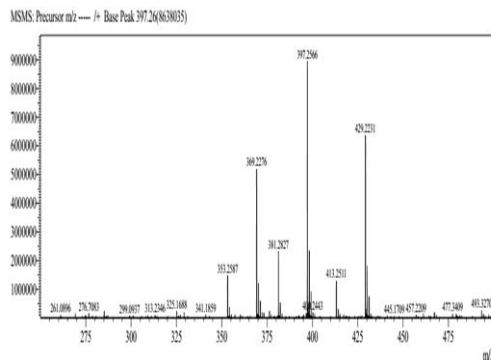
3.3. Xây dựng quy trình phân tích và định lượng Ergosterol bằng phương pháp HPLC

Lần lượt tiêm vào hệ thống mẫu trắng, mẫu thử, mẫu chuẩn. Ghi nhận sắc ký đồ, ta thấy sắc ký đồ của mẫu thử có thời gian lưu, phổ UV và độ tinh khiết pic giống với sắc ký đồ của dung dịch chuẩn Ergosterol.

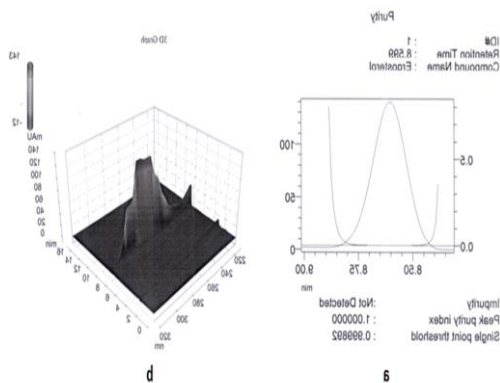
Thẩm định quy trình định lượng được mô tả theo bảng 1. Thời gian lưu: RSD = 0,23 % < 1 %; Diện tích pic: RSD = 0,14 % < 2%; Hệ số đối xứng tương ứng là 1,101 nằm trong khoảng (0,8 ÷ 1,5); Có số đĩa lý thuyết cao > 1000. Như vậy hệ thống đạt tính tương thích hệ thống. Xét về tính đặc hiệu, trên sắc ký đồ mẫu chuẩn, có thời gian lưu pic Ergosterol là 8,599 phút, mẫu trắng không có pic ở vị trí này. Độ tinh khiết của pic Ergosterol: 1,00000 và hình ảnh 3D của pic không có thành phần khác. Như vậy, phương pháp có tính đặc hiệu.

Bảng 1. Kết quả phân tích định tính hiện diện của ergosterol từ cao chiết cây địa y (*C. faveomaculata*) Makhija & Patw

Lần	Thời gian lưu t_R (phút)	Diện tích pic	Số đĩa lý thuyết	Hệ số đối xứng
1	8,599	1503144	12029,4	1,101
2	8,598	1502780	12067,2	1,102
3	8,584	1499593	12054,6	1,100
4	8,571	1498747	12005,8	1,101
5	8,573	1499327	12050,5	1,101
6	8,564	1498719	12035,6	1,103
TB	8,582	1500385	12041	1,101
RSD (%)	0,17	0,14	0,18	0,09



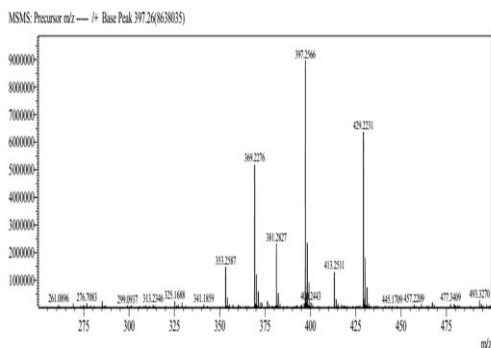
Hình 4. Phổ EI-MS: cho mảnh $[M-H]^-$ có số khối 397,29 tương ứng với công thức $[C_{28}H_{44}O - H]^-$ của Ergosterol ($M = 396,65$ g/mol)



Hình 3. Kết quả kiểm định độ tinh khiết của ergosterol từ cao

3.3. Xây dựng quy trình phân tích và định lượng Ergosterol bằng phương pháp HPLC

Lần lượt tiêm vào hệ thống mẫu trắng, mẫu thử, mẫu chuẩn. Ghi nhận sắc ký đồ, ta thấy sắc ký đồ của mẫu thử có thời gian lưu, phổ UV và độ tinh khiết pic giống với sắc ký đồ của dung dịch chuẩn Ergosterol.



Hình 4. Phổ EI-MS: cho mảnh $[M-H]^+$ có số khối 397,29 tương ứng với công thức $[C_{28}H_{44}O - H]^+$ của Ergosterol ($M = 396,65 \text{ g/mol}$)

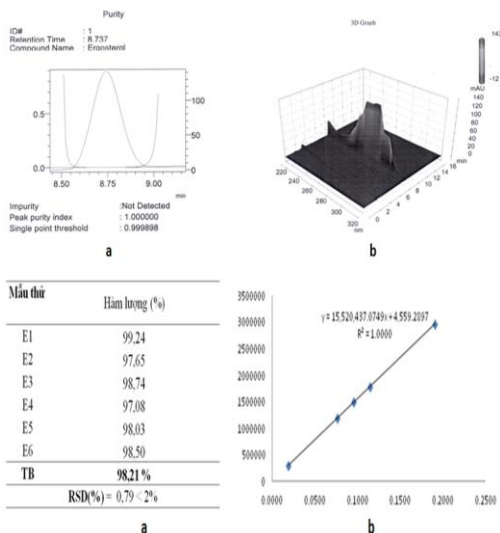
Thẩm định quy trình định lượng được mô tả theo bảng 1. Thời gian lưu: $RSD = 0,23\% < 1\%$; Diện tích pic: $RSD = 0,14\% < 2\%$; Hệ số đối xứng tương ứng là 1,101 nằm trong khoảng $(0,8 \div 1,5)$; Có số đĩa lý thuyết cao > 1000 . Như vậy hệ thống đạt tính tương thích hệ thống. Xét về tính đặc hiệu, trên sắc ký đồ mẫu chuẩn, có thời gian lưu pic Ergosterol là 8,599 phút, mẫu trắng không có pic ở vị trí này. Độ tinh khiết của pic Ergosterol: 1,000000 và hình ảnh 3D của pic không có thành phần khác. Như vậy, phương pháp có tính đặc hiệu.

Lần	Thời gian lưu t_R (phút)	Diện tích pic	Số đĩa lý thuyết	Hệ số đối xứng
1	8,599	1503144	12029,4	1,101
2	8,598	1502780	12067,2	1,102
3	8,584	1499593	12054,6	1,100
4	8,571	1498747	12005,8	1,101
5	8,573	1499327	12050,5	1,101
6	8,564	1498719	12035,6	1,103
TB	8,582	1500385	12041	1,101
RSD (%)	0,17	0,14	0,18	0,09

Bảng 1. Kết quả phân tích định tính hiện diện của ergosterol từ cao chiết cây địa y (*C. faveomaculata*) Makhija & Patw

3.4. Kiểm định kết quả phân tích và định lượng chất ergosterol bằng phương pháp HPLC

Khảo sát tính tuyến tính: Tiến hành sắc ký với mẫu chuẩn ở 5 mức nồng độ từ 0,01 mg/ml – 0,10 mg/ml. Kết quả khảo sát tính tuyến tính, $t = < t_{0,05}$, hệ số tương quan $r = 1,0000$, như vậy có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic. Phương pháp có $RSD = 0,79\% < 2\%$, như vậy phương pháp đạt độ lặp lại. Độ phục hồi của các mẫu ở từng nồng độ đều nằm trong khoảng giới hạn $98,0\% \div 102,0\%$. Vậy, phương pháp đạt yêu cầu về độ đúng.



Hình 7. Kết quả kiểm định

4. KẾT LUẬN

Đã chiết xuất phân lập và tinh chế Ergosterol từ Địa y. Xác định cấu trúc Ergosterol qua các dữ liệu: điểm chảy, phổ IR, phổ MS, và phổ NMR. Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng bằng HPLC chất Ergosterol. Kiểm tra và đánh giá chất lượng chất chuẩn đã điều chế theo các tiêu chí đánh giá chất chuẩn như

xác định các dữ liệu: điểm chảy, phổ IR, phổ MS, và phổ NMR, định tính, định lượng, độ đồng nhất giữa các lọ chuẩn và xác định giá trị ấn định theo ISO. Kết quả cho thấy chất chuẩn điều chế đạt tất cả các tiêu chí đánh giá. Tiến hành thẩm định chất chuẩn tại 2 phòng thí nghiệm độc lập đạt tiêu chuẩn ISO/GLP. Kết quả thẩm định cho thấy các chất chuẩn có chất lượng cao, đáng tin cậy, đủ điều kiện đăng kí chuẩn quốc gia. Nghiên cứu, theo dõi độ ổn định của chất chuẩn nghiên cứu để xác định được chu kì đánh giá lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. P., P. A. (2008) Chemical composition of lichens and their medical applications. *Pharm. Chem. J.* **42**, 582-588
2. Zambare V. P., C. L. P. (2012) Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharm. Biol.* **50**, 778-798
3. Rundel P. W., B. P. A. (1978) Niebla, a new generic name for the lichen genus Desmazieria (Ramalinaceae). *Mycotaxon* **6**, 497-499
4. Huneck S., Y. I. (1996) Identification of lichen substances. *Springer, Heidelberg, Germany*.
5. Boustie J., G. M. (2005) Lichens – a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genet. Resour.* **3**, 273-287
6. EM, H. (1979) How to know the lichens. *Mycologia* **72**, 218-220
7. Padgett D.E., M. M. A., Cahoon L.B., . (2000) Evaluating the Use of Ergosterol as a Bioindicator for Assessing Fungal Response to Water Quality. *Environmental Monitoring and Assessment volume* **65**, 547-558
8. Toshiyuki T., M. Y. (2004) Ergosterol Peroxide, an Apoptosis-Inducing Component Isolated from *Sarcodon aspratus*. *Jewish Business Students Association*, 212-215
9. Ivonne J. Nieto, C. C. A. (2008) Triterpenoids and fatty acids identified in the edible mushroom *Pleurotus sajor-cajú*. *J. Chil. Chem. Soc.*, **53**, 1515-1517
10. Derek H. R. Barton, J. E. T. C., David A. Widdowson, Martin Bard and Robin A. Woods (1974) Biosynthesis of terpenes and steroids. Part IX. The sterols of some mutant yeasts and their relationship to the biosynthesis of ergosterol. *Journal of the chemical Society, Perkin Trans* **1**, 1326-1333
11. Huiseon Yang¹, J. T., Chul Won Lee², Subin Ha¹, Soo Hyun Eom³ & Young Jun Im¹. (2015) Structural mechanism of ergosterol regulation by fungal sterol transcription factor Upc2. *Nature communications*
12. Ajuna Arora, H. R., and Amitabha Chattopadhyay. (2004) Influence of cholesterol and ergosterol on membrane dynamics: a fluorescence approach. *Biochem Bioph Res Co* **318**, 920-926
13. Fumiyoshi Abe , T. H. (2009) Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Acta* **1788**, 743-752
14. Marcio L. Rodriguesa, b. (2018) The Multifunctional Fungal Ergosterol. *American Society for Microbiology* **9**, 01755-01718
15. Hoang Van Trung, N. N. T., Nguyen Tan Thanh, Truong Thi Binh Giang, Dinh Thi Truong Giang, Isiaka Ogunwande and Tran Dinh, and Thang. (2018) Determination of ergosterol and ergosterol peroxide in higher fungi Species by highperformance liquid chromatography. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **7**, 2376-2379
16. Kenji Hemmi, C. J., Dai Hirata, Eiko Tsuchiya, Jon Y. Takemoto & Tokichi Miyakawa. (2014) The Physiological Roles of Membrane Ergosterol as Revealed by the Phenotypes of *syr1/erg3* Null Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 482-486
17. A. Rivera., O. L. B., J. Rios-Motas. (2009) (22E)-Ergosta-6,22-diene-3 β ,5 α ,8 α -triol: A new polyhydroxysterol isolated from *Lentinus edodes* (Shiitake). *Natural Product Research* **23**