

Aspergillus protuberus 배양물로부터 대사체 분리 및 구조 결정

백소윤 · 심상희*

영남대학교 생명공학부

Isolation and Structure Determination of Metabolites from Cultures of *Aspergillus protuberus*

So Yoon Baek and Sang Hee Shim*

School of Biotechnology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Republic of Korea

(Received April 1, 2013 / Accepted May 7, 2013)

Marine-derived microbes have yielded a variety of metabolites so far. In the course of the project to find metabolites from marine microbes, an isolate of *Aspergillus protuberus* (SF 5767) was selected for chemical investigation. A large scale culture of this strain in PDA media was extracted with an organic solvent and the extract was fractionated by silica gel column chromatography. Repeated reverse phase HPLC of the fractions led to the isolation of three metabolites. Their chemical structures were elucidated as deoxybrevianamide E (1), brevianamide V (2), and ergosterol peroxide (3) on the basis of spectroscopic data including MS, NMR, and UV. To the best of our knowledge, chemical investigation of *A. protuberus* was conducted for the first time in this study.

Keywords: *Aspergillus protuberus*, brevianamide V, deoxybrevianamide E, metabolites

*Aspergillus*는 자낭균류(子囊菌類, Ascomycetes)에 속하는 진균(眞菌)으로서, 유성생식에 의해 주머니 모양의 자낭(子囊) 속에 자낭포자(子囊孢子)를 만드는 것으로 알려져 있고, 자연계에 널리 분포되어 있다. 이 속에 속하는 진균 중 *A. fumigatus*는 mycotoxin을 분비하여 사람의 폐, 비동, 부비동, 각막, 외이도를 침범하는 aspergillosis를 일으키는 것으로 잘 알려져 있다 (Kradin and Mark, 2008). 이 외에도 *A. orizae*나 *A. niger* 같은 일부 균들의 경우에는 일반적인 조건에서는 유해한 toxin을 발현하지 않으므로, 발효에 많이 사용되어 왔다. 된장이나 간장에 들어가는 균주가 모두 *Aspergillus* 균속 중의 무해한 일부 균들이며, 알콜발효에도 기본적으로는 *Saccharomyces*가 쓰이긴 하지만, *A. niger*, *A. awamori*, *A. kawachii* 등 *Aspergillus* 중 몇몇이 사용되기도 하는 것으로 알려져 왔다(Kitamoto, 2002).

Aspergillus 속에서 분리된 화합물에는 아미노산 두 개가 아미드 결합을 통해 cyclization하여 lactam링을 형성하여 만들어진 diketopiperazine계열의 물질들(Stein, 1971, 1973; Hiort *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007), mycotoxin으로 알려진 유독한 aflatoxin이나 ochratoxin 계열의 물질들(Codner *et al.*, 1963; van der Merwe *et al.*, 1965), terrein과 같은 cyclopentanone 계열의 물질들(Park *et al.*, 2004), sphingofungin과 같은 리피드 계열의 물질들(Van Middlesworth *et al.*, 1992),

asterriquinone과 같은 benzofuroindole계 화합물(Wijeratne *et al.*, 2003) 물질들이 이 *Aspergillus* 속에서 밝혀졌다. Aflatoxin이나 ochratoxin과 같이 곰팡이 독소로 유명한 물질들도 있지만, 다른 물질들은 항균 작용(Kwon *et al.*, 2000), 항진균 작용(Houston *et al.*, 2004), 항바이러스 작용(Sinha *et al.*, 2004), 항암 작용(Nicholson *et al.*, 2006) 등을 나타내 여전히 그 중요성이 대두되고 있다.

우리나라의 해양 유래 곰팡이가 생산하는 대사체를 탐구하는 연구의 일환으로 제주도 해면에서 분리된 곰팡이 *A. protuberus*를 신라대학교 해양 미생물 추출물 은행(Marine Microbe Extract Bank, MMEB)에서 분양받아(부여번호 SF5767) 배양하여 그 배양물로부터 물질 분리를 실시하였다. 본 연구실에서는 이 곰팡이를 해수를 포함하는 PDA (potato dextrose agar) 배지에서 배양하여 유기용매(methyl ethyl ketone)로 추출한 다음 추출물을 10개의 분획으로 나누고 각 분획에 대하여 다시 반복적인 크로마토그래피를 실시하여 3종의 화합물을 분리하였다. 이 화합물들의 분리 및 구조 결정에 대하여 보고하고자 한다.

실험에 사용된 미생물 종이 해양에 서식하는 곰팡이임을 고려하여 서식지와 유사한 환경의 배지를 제조하고자 NaCl 25 g, MgCl₂·6H₂O 5 g, CaCl₂·6H₂O 1 g을 1 L의 1차 증류수에 녹여 인공해수를 제조하였다. 대량 배양을 하기 위하여 2 L Erlenmeyer flask에 인공해수와 증류수의 3:1 혼합액 1 L와 potato dextrose broth (Difco) 24 g, Agar 15 g을 녹인 후 고압증기멸균기로 121℃에서 15분간 멸균하였다. 배양액을 식힌 후

*For correspondence. E-mail: shshim29@ynu.ac.kr; Tel.: +82-53-810-3028; Fax: +82-53-810-4769

petri dish에 약 20-25 ml씩 부어 굳힌 뒤 살균된 나이프를 이용하여 배지에 곰팡이 균사를 접종한 후 25°C 인큐베이터에서 7-15일간 배양하였다. 대량 배양을 위하여, 계대 배양과 같은 방법으로 배지를 제조하였다. 살균된 백금봉으로 계대 배양한 곰팡이 포자를 긁어 내어 약 5 ml의 3차 증류수에 현탁하여 이미 제조된 배지가 들어있는 Fernbach flask에 붓고, 곰팡이가 잘 흡여져서 자라도록 흔들어진 뒤 25°C 인큐베이터에서 7-15일간 배양하였다(Kim *et al.*, 2012). 대량 배양한 Fernbach flask에 MEK (methyl ethyl ketone)을 부어놓고 약수저로 배지 전체를 으깨어 추출 용매와 닿는 표면적을 넓힌다. 그 후 2시간 정도 sonication 시킨 후 상온에서 하루 방치하고, 다음 날 그 추출액을 여과한다. 그 후 여액 중의 수분을 제거하기 위하여 무수 황산을 첨가하여 20분 가량 방치한 다음, 다시 여과하여 무수 황산을 제거한 후 여액을 감압농축기로 농축하여 추출물 1 g을 얻었다. 이 추출물에 대하여 실리카 겔을 충전한 칼럼에 클로로포름(CHCl₃) 및 아세톤(CH₃COCH₃) 혼합 용매로 비극성 용매부터 시작하여 극성을 높여 가며 기울기 용리시켜 열린 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 총 10개의 분획을 얻었다(Fr. 1-Fr. 10, Fig. 1). 이 때 칼럼 크로마토그래피용 고정상으로는 70-230 mesh의 silica gel을 사용하였다. 얻어진 분획들 중 Fr. 5 (88 mg)에 대하여 sephadex LH-20를 충전한 칼럼에 메타놀 100%로 용리시켜 열린 크로마토그래피를 수행한 결과 총 9개의 소분획을 얻었다(Fr. 5-1 ~ Fr. 5-9). 이 중 Fr. 5-3에 대하여 water 및 acetonitrile를 용매로 분취용 역상 HPLC를 수행하여 화합물 1 및 2를 분리하였다. 사용된 HPLC는 G1322A vacuum degasser, G1311A quaternary pump 및 G1315D DAD detector가 장착된 Agilent series 1200이다. 이 때 분리 조건은 Luna 5u phenyl-hexyl 100A column (250×10.00 mm, phenomenex)을 이용하여 유속 2.5 ml/min로, 처음 15분간 40% acetonitrile로 시작하여 80% acetonitrile로, 그 후 25분간 80% acetonitrile에서 100% acetonitrile로 기울기 용리시킨다(Fig. 2). 또한 Fr. 7에 대하여 메타놀 용매로 재결정을 유도하여 화합물 3을 분리하였다(Fig. 1). 분리된 화합물들은 NMR, MS 등의 분광학적인 데이터를 바탕으로 동정하였다. NMR spectrum은 Bruker DPX 300

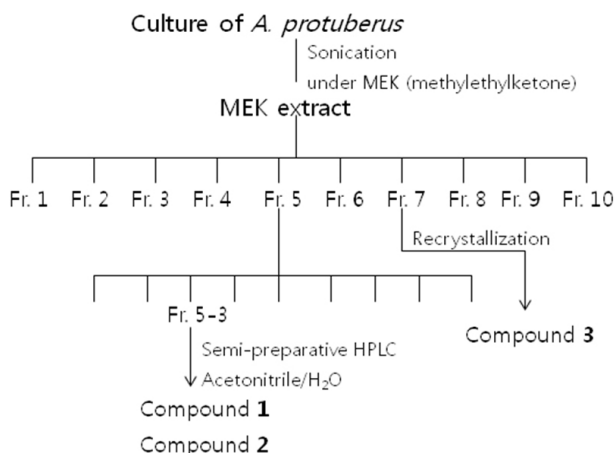


Fig. 1. Isolation scheme of compounds 1-3 from culture of *A. protuberus*.

spectrometer (¹H: 300 MHz, ¹³C: 75 MHz)를 사용하여 측정하였고, NMR용 용매로는 CDCl₃ (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)가 사용되었다. 분리된 화합물들의 순도 확인을 위해 사용한 TLC plate로는 Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)를 사용하였으며, 검출을 위해 20% aq H₂SO₄ 발색시약 및 UV 검출기가 사용되었다.

화합물 1: white powder. EI-MS *m/z* (relative intensity) 351 (8), 298 (12), 198 (100); UV λ_{max}^{EtOH} (log ε) 225 (4.51), 283 (3.91), and 291 (3.85); ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ: 7.46 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-7), 7.36 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-4), 7.11 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, H-5), 7.09 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, H-6), 6.22 (1H, dd, *J* = 17, 11 Hz, H-19), 5.13 (1H, d, *J* = 17 Hz, H-20a), 5.10 (1H, d, *J* = 11 Hz, H-20b), 4.52 (1H, dd, *J* = 9.6, 6.6 Hz, H-9), 4.24 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, H-12), 3.68 (1H, m, H-15a), 3.57 (2H, m, H-8a and H-15b), 3.14 (1H, dd, *J* = 15, 11 Hz, H-8b), 2.27 (1H, m, H-16a), 2.02-1.91 (3H, m, H-16b, H-17a, and H-17b), 1.56 (3H, s, Me-21 or 22), 1.57 (3H, s, Me-21 or 22).

화합물 2: white powder. Positive FAB-MS: *m/z* 350 [M + H]⁺; ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ: 7.41 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-7), 7.29 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-4), 7.21 (1H, s, H-8), 7.12 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, H-5), 7.09 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, H-6), 6.12 (1H, dd, *J* = 17, 10 Hz, H-19), 5.13 (1H, d, *J* = 17 Hz, H-20a), 5.08 (1H, d, *J* = 10 Hz, H-20b), 4.47 (1H, dd, *J* = 9.6, 6.6 Hz, H-12), 3.76 (1H, m, H-15a), 3.66 (1H, m, H-15b), 2.38 (1H, m, H-16a), 2.09 (1H, m, H-17a), 2.03 (2H, m, H-16b and H-17b), 1.56 (3H, s, Me-21 or 22), 1.57 (3H, s, Me-21 or 22).

Ergosterol peroxide (3) - 백색 분말. Positive FAB-MS: *m/z* 451 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 0.79 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H₃-28), 0.79 (3H, s, H₃-18), 0.80 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, H₃-21), 0.86 (3H, s, H₃-19), 0.88 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H₃-26), 0.97 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H₃-27), 3.94 (1H, m, H-3), 5.15 (2H, m, H-22,23), 6.22 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-7), 6.48 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 135.6 (C-6), 135.3 (C-22), 132.4 (C-23), 130.9 (C-7), 82.3 (C-8), 79.6 (C-5), 66.6 (C-3), 56.3 (C-17), 51.8 (C-14), 51.2 (C-4), 44.7 (C-13), 42.9 (C-24), 39.9 (C-20), 39.5 (C-12), 37.1 (C-1,10), 34.8 (C-9), 33.2 (C-25), 30.3 (C-2), 28.8 (C-15), 23.6 (C-16), 21.0 (C-11), 20.8 (C-27), 20.1 (C-26), 19.8 (C-21), 18.3 (C-19), 17.7 (C-28), 13.0 (C-18).

본 연구에서 분리된 3종의 화합물은 MS 및 NMR 등의 기기분석 방법을 이용하여 동정할 수 있었다(Fig. 3). 화합물 1의 EI-MS spectrum에서 *m/z* 351에서 molecular ion peak를 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 분자량이 홀수로 끝나 이 화합물에 함유된 질소

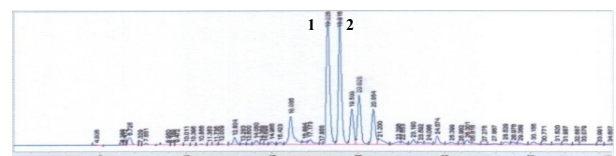


Fig. 2. HPLC chromatogram for separation of compounds 1 and 2.

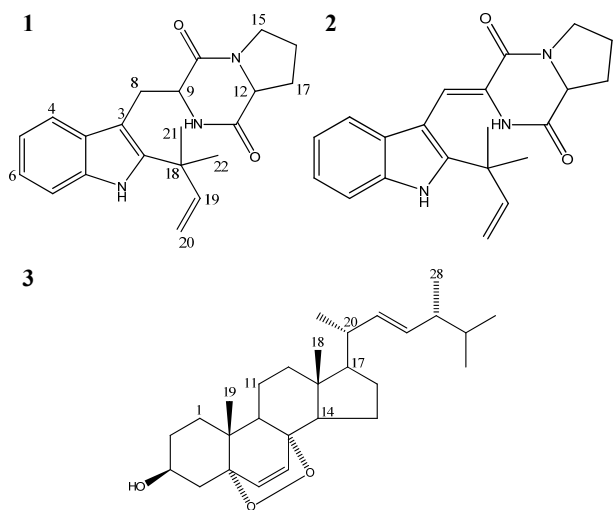


Fig. 3. Chemical structures of compounds 1-3.

의 개수가 흡수율을 확인할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum (Fig. 4B)에서 δ 7.46 및 7.36에서 각각 doublet ($J = 7.8$ Hz)으로 나타나는 signal들과 δ 7.11 및 7.09에서 각각 triplet ($J = 7.8$ Hz)으로 나타나는 signal들로 이 화합물이 1,2-disubstituted benzene moiety를 지니고 있음을 추정할 수 있었다. 또한 δ 1.56 및 1.57에서 두 개의 methyl기가 singlet으로 나타나 tertiary methyl기 두 개의 존재를 확인할 수 있었고, δ 6.22에서 나타나는 proton signal이 $J = 10, 17$ Hz의 doublet of doublet으로 나타나고, δ

5.13에서 $J = 17$ Hz의 doublet signal과 δ 5.10에서 $J = 17$ Hz의 doublet signal이 나타남에 따라 이 화합물이 mono-substituted olefin group를 지니고 있음을 추정할 수 있었다. 그리고 δ 4.52 및 4.24에서 특징적인 아미노산의 α proton을 확인하여 이 화합물이 두 개의 아미노산이 결합한 dipeptide 또는 diketopiperazine 계열의 화합물임을 예상할 수 있었다(Scott *et al.*, 1974; Wang *et al.*, 2007). 이와 같은 data를 바탕으로 이 화합물이 indole moiety를 가지고 있는 아미노산 tryptphan을 포함하고 있는 물질임을 추정할 수 있었다. 또한 UV spectrum에서 최대 흡광 파장이 225 nm, 283 nm 및 291 nm에서 나타나 이 화합물이 *Aspergillus* 속이나 *Penicillium* 속에서 많이 발견되는 brevianamide계열임을 추정할 수 있었다(Stein, 1971; Kato *et al.*, 2011). 그리고 ¹H-NMR spectrum의 δ 3.68, 3.57, 2.27 및 2.01에 나타나는 proton signal들은 아미노산 proline에 해당됨을 추정할 수 있었다. 따라서 이 화합물이 아미노산 중 tryptphan과 proline이 cyclization하여 이루어진 diketopiperazine 계열의 화합물임을 추정할 수 있었다(Fig. 2). 이상의 데이터를 문헌과 비교하여 이 화합물을 *A. ustus*에서 분리 보고된 바 있는 deoxybrevianamide E로 동정하였다(Kato *et al.*, 2011).

화합물 2의 FAB-MS spectrum (Fig. 5A)에서 m/z 350에서 $[M + H]^+$ 에 해당되는 pseudomolecular ion peak를 확인하여 이 화합물이 화합물 1에 비하여 분자량 2가 부족한 화합물임을 확인할 수 있었다. 화합물 2의 ¹H-NMR spectrum (Fig. 5B)은 화합물 1의 그것과 매우 유사하여 이 화합물 역시 brevianamide 계열의 화합물임을 확인할 수 있었다. 차이점은 화합물 1에서 나타

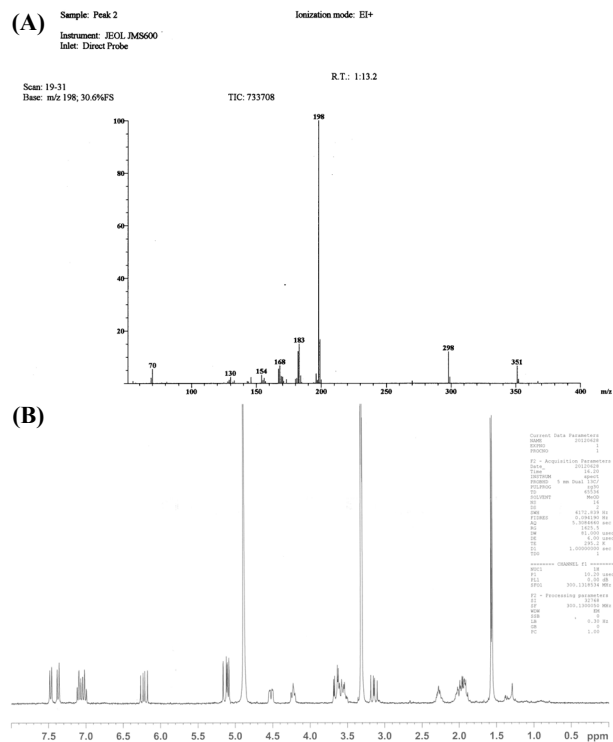


Fig. 4. Spectral data of compound 1 (A, EI-MS spectrum; B, ¹H-NMR spectrum).

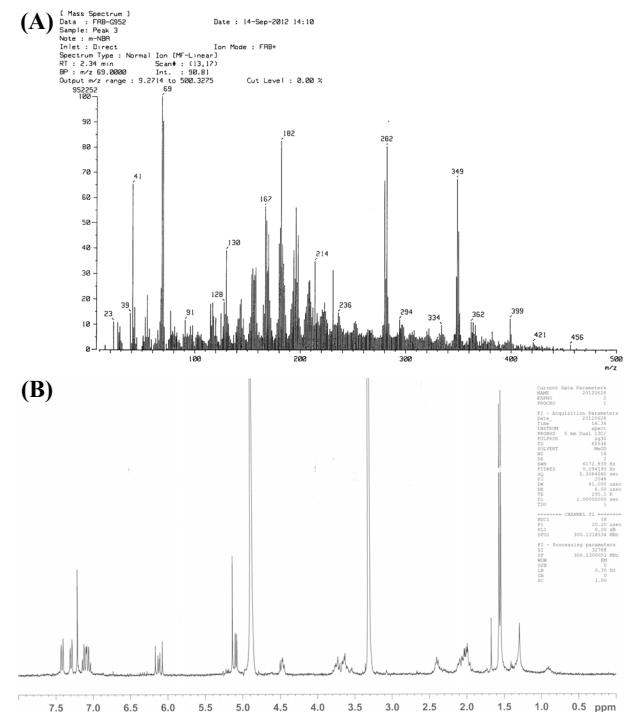


Fig. 5. Spectral data of compound 2 (A, +FABMS spectrum; B, ¹H-NMR spectrum).

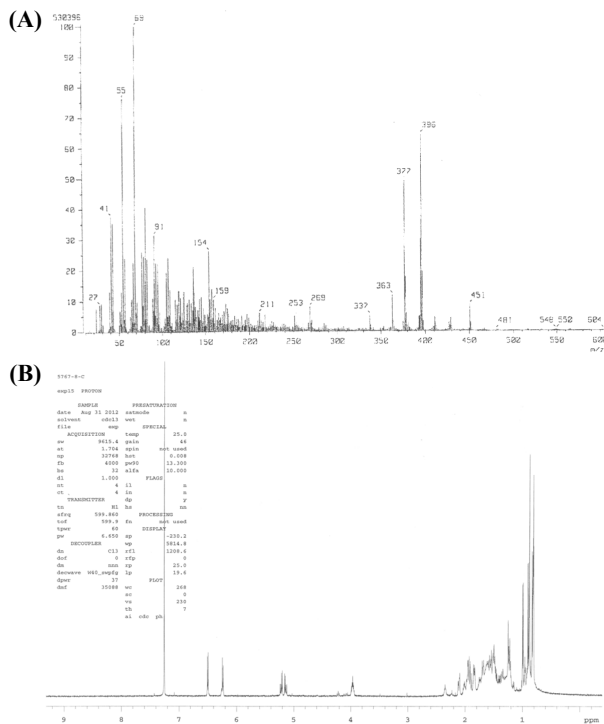


Fig. 6. Spectral data of compound 3 (A, +FABMS spectrum; B, $^1\text{H-NMR}$ spectrum).

나지 않았던 δ 7.21에서 aromatic proton signal이 singlet으로 나타났다는 점이다. 이 data와 MS data로 미루어 이 화합물은 화합물 1에 비하여 dehydration되면서 이중 결합 하나가 생성된 것임을 추정할 수 있었다(Fig. 3). 이상의 data를 문헌과 비교하여 이 화합물이 최근 해양에서 유래된 곰팡이 *A. versicolor*에서 분리된 brevianamide V임을 확인할 수 있었다(Song *et al.*, 2012). 이 화합물은 2012년 처음으로 분리 보고되었고, 따라서 천연에서 이 화합물의 분리는 본 연구에서 두 번째로 이루어졌다.

화합물 3은 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (Fig. 6B)에서 δ 0.79 및 δ 0.86에서 2개의 angular methyl기를, δ 0.79, δ 0.81, δ 0.88, 및 δ 0.97에서 4개의 secondary methyl기를 확인하여 이 화합물이 steroid 골격을 지니고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 δ 5.15에서 나타나는 multiplet의 olefin 수소들로 인해 steroid 골격의 side chain에 이중결합이 있음을 추정할 수 있었다. 그리고 δ 6.22와 δ 6.48에서 각각 doublet으로 olefine 수소들이 일반적인 olefin 수소들에 비해 저자장으로 이동하여 나타남으로 주위에 peroxy group이 존재함을 추정할 수 있었다(Fig. 3). 이상의 $^1\text{H-NMR}$ spectral data를 검토하고 문헌과 비교하여 화합물3을 ergosterol peroxide로 동정하였다(Jin *et al.*, 1999).

적요

해양에서 유래된 미생물들은 지금까지 다양한 대사체들을 생산해 왔다. 해양 미생물로부터 대사체를 규명해 내고자 하는 연구의 일환으로, *Aspergillus protuberus*가 선택되었다. 이 균주를

대량 배양하여 배양물을 유기용매로 추출한 후, 추출물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 분획하였다. 그 후 분획물에 분취용 HPLC 등을 실시하여 총 3종의 대사체들을 분리하였다. 분리된 대사체들의 화학적 구조는 NMR, MS, UV 등의 기기분석 방법을 이용하여 각각 deoxybrevianamide E (1), brevianamide V (2) 및 ergosterol peroxide (3)로 동정하였다. 이 *A. protuberus*가 생산해 내는 대사체에 관한 연구는 본 연구에서 처음으로 이루어졌다.

감사의 말

본 연구는 2010년도 한국연구재단-일반연구자지원사업의 지원을 받아 수행된 연구(2010-0023753)이며 이에 감사를 포함한다. 사용된 미생물 균주는 신라대학교 해양 미생물 추출물 은행에서 제공하였습니다.

참고문헌

- Codner, R.C., Sargeant, K., and Yeo, R. 1963. Production of aflatoxin by the culture of strains of *Aspergillus flavus-oryzae* on sterilized peanuts. *Microbiol. Res.* **5**, 185-192.
- Hiort, J., Maksimenka, K., Reichert, M., Perovic-Ottstadt, S., Lin, W.H., Wray, V., Steube, K., Schaumann, K., Weber, H., Proksch, P., and *et al.* 2004. New natural products from the sponge-derived fungus *Aspergillus niger*. *J. Nat. Prod.* **67**, 1532-1543.
- Houston, D.R., Synstad, B., Eijsink, V.G., Stark, M.J., Eggleston, I.M., and van Aalten, D.M. 2004. Structure-based exploration of cyclic dipeptide chitinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **47**, 5713-5720.
- Jin, W.B., Lerner, L., Chilton, J., Klingeman, H., and Towers, G.H. 1999. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry* **51**, 891-898.
- Kato, H., Nakamura, Y., Finefield, J.M., Umaoka, H., Nakamura, T., Williams, R.M., and Tsukamoto, S. 2011. Study on the biosynthesis of the notoamides: pinacol-type rearrangement of the isoprenyl unit in deoxybrevianamide E and 6-hydroxydeoxybrevianamide E. *Tetrahedron Lett.* **52**, 6923-6926.
- Kim, M.-Y., Son, J.H., Jang, J.-H., Ahn, J.S., and Oh, H. 2012. Two new botcinin derivatives encountered in the studies of secondary metabolites from the marine-derived fungus *Botryotinia* sp. SF-5275. *J. Antibiot.* **65**, 161-164.
- Kitamoto, K. 2002. Molecular Biology of the *Koji* Molds. *Adv. Appl. Microbiol.* **51**, 129-153.
- Kradin, R.L. and Mark, E.J. 2008. The pathology of pulmonary disorders due to *Aspergillus* spp. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **132**, 606-614.
- Kwon, O.S., Park, S.H., Yun, B.S., Pyun, Y.R., and Kim, C.J. 2000. Cyclo(dehydroala-L-Leu), an α -glucosidase inhibitor from *Penicillium* sp. F70614. *J. Antibiot.* **53**, 954-958.
- Liu, Y., Li, X., Kim, S., Kang, J.S., Choi, H.D., Rho, J.R., and Son, B.W. 2004. Golmaenone, a new diketopiperazine alkaloid from the marine-derived fungus *Aspergillus* sp. *Chem. Pharm. Bull.* **52**, 375-376.
- Nicholson, B., Lloyd, G.K., Miller, B.R., Palladino, M.A., Kiso, Y., Hayashi, Y., and Neuteboom, S.T. 2006. NPI-2358 is a tubulin-depolymerizing agent: *In vitro* evidence for activity as a tumor vascular-disrupting agent. *Anti-Cancer Drugs* **17**, 25-31.

- Park, S.H., Kim, D.S., Kim, W.G., Ryoo, I.J., Lee, D.H., Huh, C.H., Youn, S.W., Yoo, I.D., and Park, K.C. 2004. Terrein: a new melanogenesis inhibitor and its mechanism. *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 2878-2885.
- Scott, P.M., Kennedy, B.P.C., Harwig, J., and Chen, Y.-K. 1974. Formation of diketopiperazines by *Penicillium italicum* isolated from oranges. *Appl. Microbiol.* **28**, 892-894.
- Sinha, S., Srivastava, R., de Clercq, E., and Singh, R.K. 2004. Synthesis and antiviral properties of arabino and ribonucleosides of 1,3-dideazaadenine, 4-nitro-1,3-dideazapurine and diketopiperazine. *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **23**, 1815-1824.
- Song, F., Liu, X., Guo, H., Ren, B., Chen, C., Piggott, A.M., Yu, K., Gao, H., Wang, Q., Liu, M., and *et al.* 2012. Brevianamides with antitubercular potential from a marine-derived isolate of *Aspergillus versicolor*. *Org. Lett.* **14**, 4770-4773.
- Stein, P.J. 1971. Austamide, a new toxic metabolite from *Aspergillus ustus*. *Tetrahedron Lett.* **36**, 3331-3334.
- Stein, P.J. 1973. The structures of five diketopiperazines from *Aspergillus ustus*. *Tetrahedron* **29**, 107-120.
- van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L., Scott, D.B., and Theron, J.J. 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* **205**, 1112-1113.
- Van Middlesworth, F., Giacobbe, R.A., Lopez, M., Garrity, G., Bland, J.A., Bartizal, K., Fromtling, R.A., Polishook, J., Zweerink, M., and Edison, A.M. 1992. Sphingofungins A, B, C, and D; a new family of antifungal agents. I. Fermentation, isolation, and biological activity. *J. Antibiot.* **45**, 861-867.
- Wang, W., Lu, Z., Tao, H., Zhu, T., Fang, Y., Gu, Q., and Zhu, W. 2007. Isoechinulin-type alkaloids, varicolorins A-L, from halotolerant *Aspergillus varicolor*. *J. Nat. Prod.* **70**, 1558-1564.
- Wijeratne, E.M., Turbyville, T.J., Zhang, Z., Bigelow, D., Pierson, L.S., VanEtten, H.D., Whitesell, L., Canfield, L.M., and Gunatilaka, A.A. 2003. Cytotoxic constituents of *Aspergillus terreus* from the rhizosphere of *Opuntia versicolor* of the Sonoran Desert. *J. Nat. Prod.* **66**, 1567-1573.