

증강 화학발광 기법을 이용한 horseradish peroxidase(HRP)의 검량

김원기 · 김근한* · 이승목**†

그린텍

*선진환경

**관동대학교 환경공학과

Determination of Horseradish Peroxidase (HRP) using an Enhanced Chemiluminescence Assay

Wongee Kim · Keunhan Kim* · Seungmok Lee**†

GreenTech.Co., Ltd.

*Sunjin Environment Co., Ltd.

**Department of Environmental Engineering, Kwandong University

(Received 23 January 2008, Revised 28 October 2008, Accepted 10 November 2008)

Abstract

Our nation's water resources remain susceptible to contamination by phenolic agrichemicals. These compounds can be toxic to a variety of organisms including humans. Their disposal is restricted in many countries with strict limits for acceptable concentrations in drinking water. Enzyme-mediated *in situ* stabilization has been advocated as an approach for the treatment of phenolic compounds in soils and groundwater. This study reports the development of a new approach to quantify the activity of the HRP enzyme in aqueous systems. The method is based on the coupled processes of energy transfer and enhanced chemiluminescence using a luminol-H₂O₂-HRP system. In this study, the effects of solution pH, ionic strength and aqueous concentrations of HRP, H₂O₂ and enhancer were evaluated on the *p*-iodophenol-enhanced, HRP-catalyzed chemiluminescence reaction intensity in Tris-HCl buffer. All assay components were found to affect the maximum chemiluminescence intensity. The calibration curve for HRP showed the linear relationship with maximum light intensity.

keywords : Calibration curve, Chemiluminescence, Horseradish Peroxidase (HRP), Ionic strength

1. 서론

HRP(horseradish peroxidase)는 H₂O₂에 의해서 효소가 효소중간체로 변환되어 이들 효소 중간체에 의해 방향족 분자의 라디칼을 형성하게 되고, 이들 방향족 라디칼들이 서로 결합하게 되어 고분자를 형성하게 되는 반응의 촉매역할을 하는 효소이다. HRP 의해서 생성된 라디칼은 서로 결합하여 고분자로 변환된다. 페놀을 기질로 한 과산화효소의 반응이 수용액에서 이루어질 경우, 생성된 페놀 고분자의 용해도가 급격히 감소하게 되어 침전물질을 형성하게 된다. HRP의 활동도는 페놀의 제거에서 매우 중요하며 이를 검출하기위해 다양한 시도들이 있어왔다. 그중 화학발광 현상은 오랜 기간 연구되어 왔지만 액상 반응에서 화학발광의 분석학적 적용은 1980년대부터 보고되었다. 과산화효소를 이용하여 수용액으로부터 페놀성분을 제거하는 방법은 Klibanov 등(1983)에 의해서 보고된 이후 활발히 연구되어 왔으며 HRP의 활성도는 색채측정법, 형광측정법 그

리고 화학발광법에 의해 정량되어왔다. HRP-luminol-H₂O₂ 혼합용액을 사용하는 화학발광법은 HRP의 정량을 위한 간단하고 세밀한 기법으로서 주목받고 있다. 1980년대 중반 luminol(5-amino-2,3 dihydrophthalazine-1,4-dione)과 관련하여 화학발광을 현저히 증가시킬 수 있는 화합물로서 *p*-iodophenol의 발견은 증강 화학발광(enhanced chemiluminescence, ECL) 기법의 발전을 초래하였다(Thorpe et al., 1985a; Thorpe and Kricka, 1986). 또한 반딧불 루시페린과 6-hydroxybenzothiazole 파생물질(Thorpe et al., 1985b), 4-iodophenol(Thorpe and Kricka, 1986) 그리고 4-(4-hydroxyphenyl)thiazole(Li et al., 1993) 같은 다양한 페놀 치환 물질들도 효과적인 증강시약으로 알려졌다. 증강 화학발광법에서 빛의 발생은 증강시약으로써 알려진 *p*-iodophenol같은 화합물을 HRP-luminol-H₂O₂ 혼합용액에 첨가될 때 발생한다. 화학발광기법은 200 mM 정도의 낮은 액상 HRP의 농도를 검출할 수 있다고 보고되었으며 효소, 세포 또는 조직 계통 및 항산화 활성도를 screening하거나 자유 라디칼들을 모니터링하기 위해 HRP-luminol-H₂O₂ 시스템의 적용을 확대시켰다(Yasaei et al., 1996).

Luminol을 이용한 화학발광기법에 영향을 주는 다양한

† To whom correspondence should be addressed.
leesm@kd.ac.kr

변수들이 연구되어왔지만(Kricka and Thorpe, 1983), HRP-luminol-H₂O₂ 시스템에서 pH, 증강시약 및 이온강도의 영향에 대한 연구는 미비한 실정이다.

본 연구에서는 액상 시료내의 HRP 활성도의 정량을 위한 HRP-luminol-H₂O₂ 시스템에 영향을 미치는 인자들을 조사하였다: pH, H₂O₂, HRP, *p*-iodophenol 농도, H₂O₂/luminol 몰비 및 이온강도.

2. 연구방법

2.1. 시약 및 재료

HRP(Type II, RZ:2.2, 181 activity units/mg), luminol (5-amino-2,3 dihydrophthalazine 1,2-dione), 과산화수소(30% w/w)와 *p*-iodophenol은 Sigma Chemical(St. Louis, MO)로부터 구입한 후 4°C에서 저장하여 사용하였다. 효소의 활성도를 나타내기 위해 1 Activity Unit(AU)의 HRP는 pH 6.0, 20°C에서 20초간 pyrogallol로부터 1 mg의 purpurogallin을 형성하는 양으로 정의하였다. 과산화수소 저장용액(150 mM)은 30%(w/w)의 원액을 희석하여 assay 용액에 첨가하기 1시간 전에 제조하였다. HRP(181 activity units/mg)의 저장용액은 30 AU/mL로 사용 2시간 전에 제조하였다.

화학발광 assay는 luminol, *p*-iodophenol, HRP와 H₂O₂로 구성되어진다. 화학발광 측정에 사용된 모든 용액들은 이온강도를 조절하기 위하여 Tris-HCl 완충용액(1 M, pH 8.5)을 희석하여 사용하였다. Kinetic 연구에서의 모든 용액은 50 mM Tris-HCl buffer로 준비하였다. Assay 구성성분들의 최적 농도 및 최적 이온강도, pH의 영향을 결정하기 위해, 본 연구에서의 실험들은 먼저 0.5 mM luminol, 0.1 mM *p*-iodophenol, 2.0 AU/mL의 HRP 그리고 5 mM H₂O₂로 구성된 기본 반응 조건들에서 실험되었다. 화학발광 강도의 측정은 다른 광원들의 방해영향을 최소로 하기위해 모든 광원을 소등한 후 EPP Miniature Fiber Optic Spectrometer (StellarNet, Inc. FL)를 사용하여 측정하였다.

2.2. 실험방법 및 장치

H₂O₂를 제외한 각 assay 성분(HRP, *p*-iodophenol, and luminol)들을 각각 100 uL씩 분취하여 테스트 튜브(5 mL)에 옮겨졌고 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.5)를 첨가하여 최종 부피를 2.9 mL로 하였다. 30분 후 테스트 튜브는 광검출기가 연결된 암실에 위치시켰다. 화학발광 반응을 시발하기 위해 일정량의 H₂O₂를 Hamilton syringe를 사용하여 주입하였다. Assay 용액 대신 blank로써 탈이온 증류수를 사용하여 동일한 과정으로 수행하였다.

H₂O₂를 주입함과 동시에 Chamber-cap을 닫아 외부 빛을 차단하였다. Fig. 1은 대략적인 화학발광 검출 시스템의 개략도를 나타낸다. 화학발광 반응으로부터 발생한 빛의 강도(I_{CL})는 EPP Miniature Fiber Optic Spectrometer와 내장된 Spectrawiz Software를 사용하여 검출 및 분석하였다. 425 nm에서 I_{CL} 는 매 300 microsecond마다 10번의 측정을 평균하여 매 5초마다 5분간 화학발광 프로파일(CIP: chemilu-

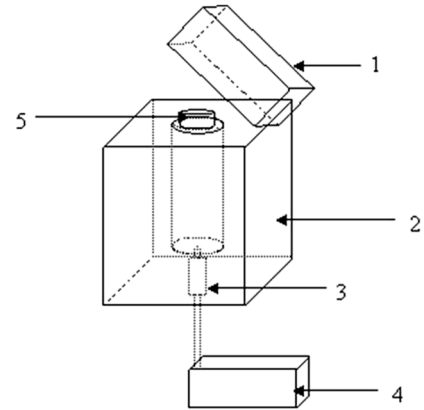


Fig. 1. Schematic diagram of chemiluminescence detection system. The chamber cap (1), dark chamber (2), light detector probe (3), light detector (4), and test tube (5).

minescence intensity profile -CIP)을 기록하였다.

H₂O₂는 화학발광 데이터가 기록되기 시작된 2초 후에 주입하였다. I_{CLmax} (maximum chemiluminescence intensity)는 측정된 후 내장된 프로그램을 사용하여 CIP(A_{CIP})의 총 면적을 계산하였다. 검량선을 도출하기위하여 I_{CLmax} 값을 사용하였다. 화학발광에 대한 HRP 주입량의 영향은 pH 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 및 10.5에서 측정되었다. 이온강도의 영향은 10~1000 mM의 범위에서 측정하였으며 luminol 농도의 영향은 0.5, 0.63, 0.83, 1.25, 2.5, 및 5 mM을 사용하여 평가하였다. 모든 실험은 20±2°C에서 3번씩 측정하였다. 여러 assay 구성요소들에 대한 최적 조건이 결정된 후 HRP와 H₂O₂에 대한 검량선을 작성하였다.

3. 결과 및 고찰

중강 화학발광기법은 *p*-iodophenol같은 증강시약의 첨가로 HRP에 의해 촉진된 luminol의 산화 반응 동안 향상된 빛의 방출 현상을 나타낸다. 본 연구에서는 pH, H₂O₂ 농도, 증강시약 농도 그리고 이온강도의 영향이 연구되었으며 HRP-luminol-iodophenol 시스템을 사용하여 임의의 시료내에 있는 HRP 농도를 결정하기 위한 검량선을 개발하였다.

3.1. pH의 영향

luminol-화학발광은 용액의 pH에 많은 영향을 받는다 (Ilyina et al., 2003; Thorpe et al., 1984; Thorpe and Kricka, 1986). H₂O₂, HRP, luminol 및 증강시약의 농도는 일정하게 유지되었고 버퍼 용액의 pH는 5.5~10.5 범위로 조정하였다. Fig. 2는 여러 다른 이온강도에서 (10, 50, 100, 500 mM) 최대 화학발광강도에 대한 pH의 영향을 나타낸다.

I_{CLmax} 는 pH 8.5에서 최대값에 도달하였으며 용액의 pH에 영향을 받았다. 과산화 효소 촉매 반응 동안 생산된 중간생산물들은 pH에 영향을 주었고 약 알칼리 pH 조건에서 더 안정한 값을 보였다. Assay 용액 pH는 또한 pH 8.5에서 최적 반응을 보이며 효소 활성의 효과를 증가시켰다.

Thorpe 등(1985a)은 *p*-iodophenol에 의한 화학발광 강도

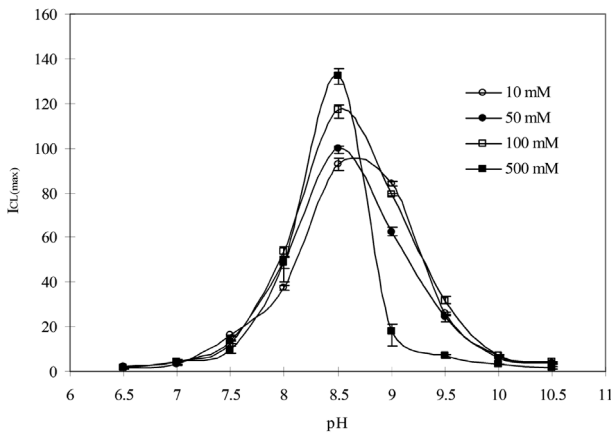


Fig. 2. Effect of assay solution pH and ionic strength on I_{CLmax} . $[H_2O_2] = 5$ mM, $[luminol] = 0.5$ mM, $[p\text{-iodophenol}] = 0.1$ mM and $HRP = 1$ AU/mL.

의 증가가 약 pH 8.6에서 최대 발광 강도를 가지며 pH에 상당히 의존적이라고 보고하였다. 본 연구에서는 pH 8.5에서 최대 화학발광 강도를 나타냈기 때문에 이후의 실험에서 최적 용액 pH로 선택하였다. 화학발광 강도에 대한 이온강도의 영향은 10 mM, 50 mM, 100 mM 및 500 mM Tris-HCl 용액을 사용하여 평가하였다. pH 8.5에서의 10 mM과 50 mM의 버퍼용액에 대한 I_{CLmax} 값이 유사한 반면, 100 mM과 500 mM의 버퍼 용액에서는 많은 I_{CLmax} 값의 차이를 나타내었다.

3.2. H_2O_2 와 증강시약 농도의 영향

화학발광 강도에 대한 H_2O_2 의 영향은 Fig. 3에 나타내었다. I_{CL} 은 H_2O_2 3 mM의 농도까지 급격히 증가하였으며, 그 후 7 mM까지 완만하게 증가하였지만 7 mM 이상의 H_2O_2 농도에서, 화학발광 강도는 급격히 감소하였다. Cormier and Prichard(1968)는 본 연구와 유사한 실험조건하의 실험에서 H_2O_2 농도를 0~6.5 mM까지 증가시켰을 때 화학발광 강도가 증가하였다고 보고하였다. Osman 등(2000)은 H_2O_2 농도가 증가함에 따라 I_{CLmax} 가 계속 증가하였다고 보고한 반면 Nicell 등(1993)은 과량의 H_2O_2 조건에서 효소의 불활성화가 일어났다고 보고하였다. Wu 등(1997)은 H_2O_2 /기질의 비율이 최적 값까지 증가시켰을 때 HRP의 효율이 증가되었지만 최적값 이상의 비율에서는 HRP의 효율이 떨어진다고 보고하였다. 본 연구에서는 최적 H_2O_2 농도가 5~8 mM 사이에서 나타났기 때문에 최소농도인 5 mM의 H_2O_2 를 최적 농도로 선택하였다.

증강시약 농도의 영향에 있어서(Fig. 4), 최대 화학발광 강도를 발생시키는 최대 증강시약의 농도는 혼합용액의 H_2O_2 및 luminol의 농도 그리고 증강시약의 특성에 따라 변한다. Yeh and Lin(2002)은 여러 증강시약들을 다양한 pH 조건에서 평가하였을 때 I_{CLmax} 값이 상당한 범위로 변화하였다고 보고하였다. Thorpe 등(1985a)은 화학발광 강도의 증가는 사용된 증강시약의 농도의 영향을 받는다고 보고하였으며 본 연구에서 얻어진 최대 증강시약 농도와 유사한 0.34 mM의 *p*-iodophenol를 최적 증강시약 농도로 보고하였다.

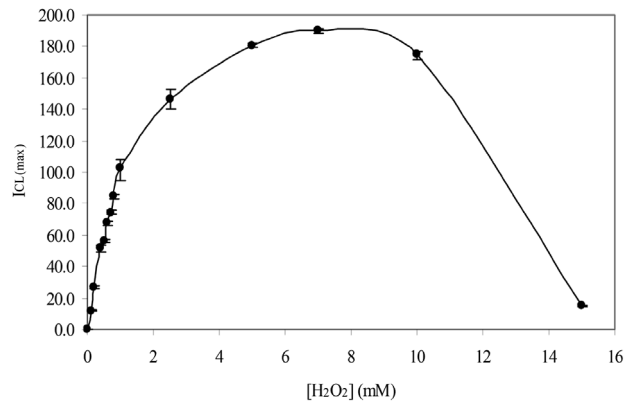


Fig. 3. Effect of H_2O_2 concentration on I_{CLmax} . $[Luminol] = 0.5$ mM, $[p\text{-iodophenol}] = 0.1$ mM, $HRP = 2$ AU/mL, $[ionic\ strength] = 50$ mM and pH 8.5.

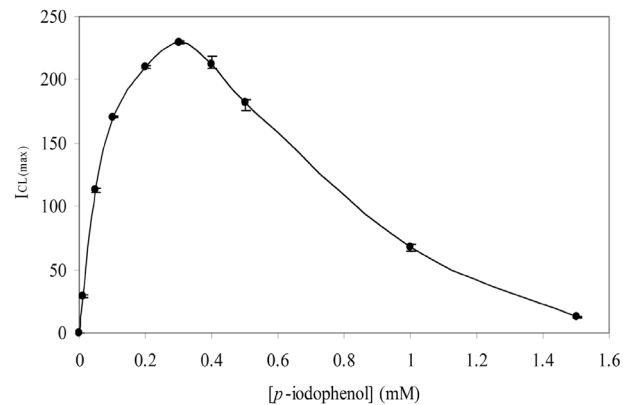


Fig. 4. Effect of enhancer concentration on I_{CLmax} . $[H_2O_2] = 5$ mM, $[luminol] = 0.5$ mM, $HRP = 2$ AU/mL, $[ionic\ strength] = 50$ mM and pH 8.5.

증강시약 농도의 영향은 H_2O_2 의 영향과 유사한 경향을 나타내었다. 본 연구에서는 0.1 mM의 *p*-iodophenol 농도에서 175 값의 I_{CLmax} 를 나타내었다. 최대 화학발광 강도는 0.3 mM의 *p*-iodophenol 농도에서 나타났으나 반복시험에서 결과 값들의 변화폭이 매우 커 신뢰도가 떨어져 보다 안정한 결과 값을 나타낸 0.1 mM의 *p*-iodophenol 농도를 이후의 실험에서 최적 증강시약 농도로 선택하였다.

3.3. H_2O_2 /Luminol 몰비의 영향

최대 화학발광 강도에 대한 H_2O_2 /luminol 몰비의 영향은 Fig. 5에 나타내었다. 본 연구에서는 최적 H_2O_2 농도(5 mM)가 이전의 실험에서 결정되었기 때문에 luminol 농도를 0.5~5 mM로 변화시키며 최대 발광강도를 측정하였다. I_{CLmax} 값은 H_2O_2 /luminol 비 값이 증가함에 따라 증가하였다. 화학발광 강도는 처음 H_2O_2 /luminol가 증가함에 따라 급격히 증가하다가 H_2O_2 /luminol의 몰분율 값이 10 이상에서 약 130 값으로 안정화되었다. Li 등(2004)은 luminol and H_2O_2 농도가 증가함에 따라 화학발광강도가 계속적으로 증가하였지만 ICL의 증가는 0.5 mM의 luminol 농도 이하 및 20 이상의 H_2O_2 /luminol 몰비에서는 매우 작았음을 보고하였다. H_2O_2 /luminol 최적 몰비 값 10을 기초하여 H_2O_2

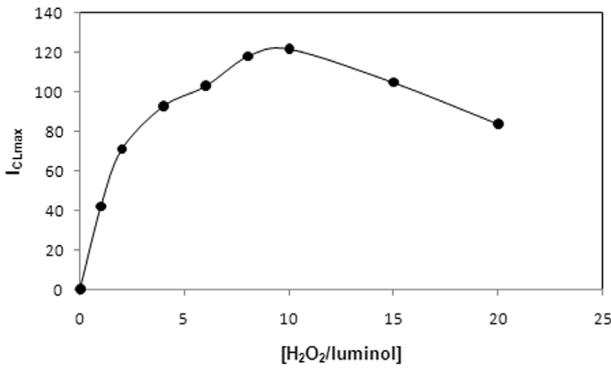


Fig. 5. Effect of $[H_2O_2]/[luminol]$ ratio on I_{CLmax} values. $[H_2O_2] = 5 \text{ mM}$, $[p\text{-iodophenol}] = 0.1 \text{ mM}$, $HRP = 1 \text{ AU/mL}$, $[ionic \ strength] = 50 \text{ mM}$ and $pH \ 8.5$.

와 luminol의 최적 농도는 각각 5 mM과 0.5 mM로 선택하였다.

3.4. 이온강도의 영향

I_{CLmax} 에 대한 이온강도의 영향은 pH 8.5에서 이온강도 10~900 mM 범위에 대해 조사하였다. pH 8.5 Tris-HCl 완충용액(10 mM)의 이온강도를 증가시키기 위해 NaCl을 사용하였다. Fig. 6은 pH 8.5에서 I_{CLmax} 에 대한 이온강도의 영향을 나타낸다. 최대 발광강도에 대해 조사된 전 범위의 이온강도에서 선형 관계를 나타내었다. 이러한 결과는 $C(H_3BO_3)$ 를 사용하여 2~10 mM의 이온강도에서 calpain (Cu(II)-based enzyme)을 이용하였을 때 완충용액 농도가 증가함에 따라 화학발광 강도가 감소하였다고 보고한 Li 등(2004)의 결과와 다르다. 그들은 높은 이온강도에서 Cu(II)-protein 착화물의 형성을 방해하기 때문이라고 설명하였다. Borgesa and Reis(2005) 또한 높은 이온강도가 효소 활성도를 저해하는 것으로 보고하였다. 이들 연구자들은 KBr 완충용액의 이온강도를 증가시킴에 의해 발광강도가 감소하는 실험결과를 제시하고 화학발광기법에 사용된 효소의

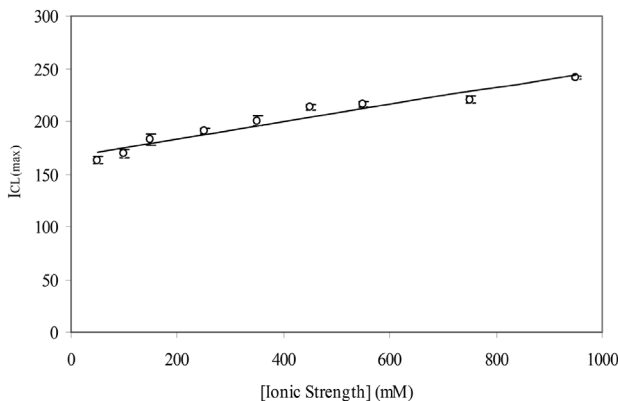


Fig. 6. Effect of reagent ionic strength (10 to 900 mM) on observed chemiluminescence intensity. $[H_2O_2] = 5 \text{ mM}$, $[luminol] = 0.5 \text{ mM}$, $[p\text{-iodophenol}] = 0.1 \text{ mM}$, $HRP = 1 \text{ AU/mL}$ and $pH \ 8.5$. R^2 value for linear fit = 0.937. Error bars indicate one standard deviation of triplicate samples.

종류와 발광시약의 종류에 따라 이온강도의 영향이 다를 것을 보고하였다. 본 연구에서는 이온강도를 증가시키기 위해 NaCl 사용하였는데 용액내의 이온의 종류가 화학발광강도에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

3.5. 효소 농도의 영향

Fig. 7은 화학발광 강도에 대한 HRP 농도의 영향을 나타낸다. I_{CLmax} 값은 효소 농도가 증가함에 따라 증가하였다. Motsenbocker and Knodo(1994)는 최대 발광강도를 얻는데 필요한 지체시간이 시약들(H_2O_2 , luminol, enhancer 및 HRP)의 혼합 후 빛 방출의 지체시간과 관련 있음을 보고하였다. 지체 현상은 저농도의 HRP에서 화학발광에 영향을 주기 때문에 시간에 따라 HRP의 농도에 대한 빛의 방출을 비선형 관계로 만든다(Motsenbocker and Knodo, 1994).

본 실험에서는 고농도의 효소를 사용하였기 때문에 지체 시간이 관찰되지 않았다. Fig. 7에서 보는 바와 같이, 최대 화학발광 강도는 혼합용액에 H_2O_2 첨가 후 5초 내에 발생하였다. HRP량이 증가할수록 I_{CLmax} 값은 증가하였다. CIP 곡선의 면적이 저농도의 효소에서 HRP 활성도에 따라 일관적인 관계를 나타내지 않았기 때문에, CIP의 면적대신 용액 내 임의의 HRP 활성도를 측정하기 위한 적절한 인자로 I_{CLmax} 를 선택하였다.

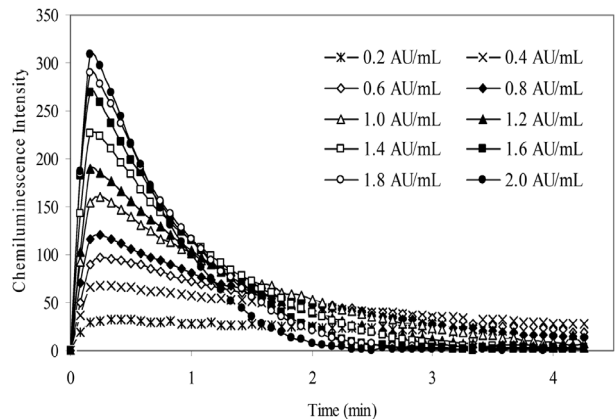


Fig. 7. Effect of HRP dose on the chemiluminescence intensity profile (CIP) at pH 8.5. $[H_2O_2] = 5 \text{ mM}$, $[luminol] = 0.5 \text{ mM}$, and $[p\text{-iodophenol}] = 0.1 \text{ mM}$, $[ionic \ strength] = 100 \text{ mM}$.

3.6. 효소 검량선

화학발광은 반응에 사용되는 상업용 HRP의 순도와 검출기의 종류에 따라 변할 수 있기 때문에 검량선은 검출기 및 HRP의 종류에 따라 각각 작성되어야 한다. 앞서 설명된 assay 조건에서 여러 효소 활성도에 따른 최대 화학발광강도의 HRP 검량선을 작성하였다. 최대 화학발광강도는 0~2.0 AU/mL의 효소량 범위에서 비례하여 증가하였다(Fig. 8). I_{CLmax} 와 HRP 농도사이의 관계는 다음의 식 (1)에 의해 나타낸 선형 관계를 나타내었다:

$$I_{CLmax} = 168.44 \text{ (HRP dose)} \tag{1}$$

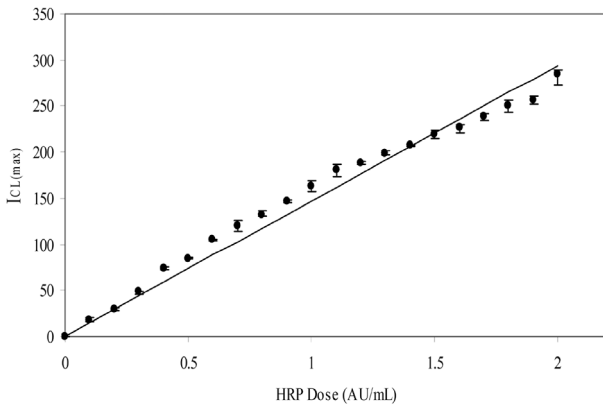


Fig. 8. Calibration curve for I_{CLmax} values versus HRP dose (0 to 2.0 AU/mL). $[H_2O_2] = 5$ mM, $[luminol] = 0.5$ mM, and $[p\text{-iodophenol}] = 0.1$ mM, $[ionic\ strength] = 100$ mM and pH 8.5. R^2 value for linear fit = 0.997.

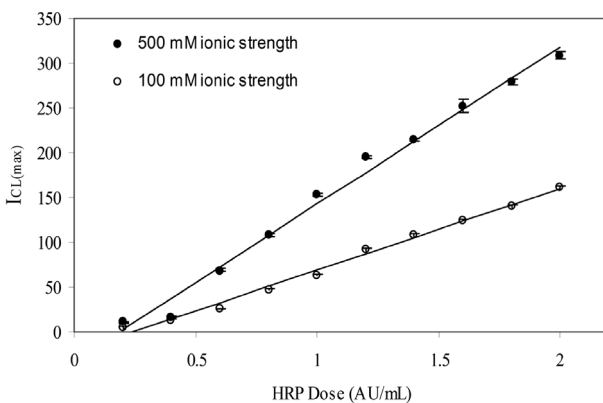


Fig. 9. Calibration curve for I_{CLmax} values versus HRP dose (0 to 2.0 AU/mL) at reagent ionic strengths of 100 mM and 500 mM. $[H_2O_2] = 5$ mM, $[luminol] = 0.5$ mM, and $[p\text{-iodophenol}] = 0.1$ mM and pH 8.5.

I_{CLmax} 와 HRP 양의 사이의 관계는 0~2.0 AU/mL 이상의 고농도의 HRP에서까지 선형관계를 유지하였다.

하지만 assay 용액의 이온강도는 검량선에 대해 현저한 영향을 끼쳤다(Fig. 9). 최대발광강도는 100 mM에 비해 500 mM의 이온강도에서 훨씬 높았지만 선형관계를 유지하였다. 그러므로 assay 용액의 이온강도를 증가시키면 luminol-화학발광 기법을 사용하여 HRP 검출의 정확성을 현저히 증가시킬 수 있는 잠재성을 가진다. Fig. 9는 다음의 선형 식에 의해 나타내어질 수 있다.

$$I_{CLmax} = 158.07 (\text{HRP dose}) - 22.1 \quad (500 \text{ mM of ionic strength}) \quad (2)$$

$$I_{CLmax} = 85.97 (\text{HRP dose}) - 14.8 \quad (100 \text{ mM of ionic strength}) \quad (3)$$

4. 결론

본 연구는 H_2O_2 -luminol-enhancer-HRP system에 있어서

화학발광강도에 대한 여러 assay 조건들에 대한 영향을 조사하였다. 실험결과들은 luminol-based chemiluminescence를 이용하여 액상용액내의 HRP 활성도를 정량할 수 있음을 보여주었다. 모든 assay 조성성분들은 최대 화학발광강도에 영향을 주었다. 너무 높거나 낮은 H_2O_2 농도는 화학발광강도에 부정적인 영향을 끼쳤다. 증강시약의 농도는 최대 화학발광강도에 대해 특정 범위에서 최적 농도를 가진다. 화학발광 강도는 $H_2O_2/luminol$ 의 비가 증가할수록 증가하였으며, pH가 8.5이상 또는 이하로 변하였을 때 감소하였다. 이온강도의 증가는 최대 화학발광강도를 증가시키는 영향을 나타내었다. 최대 발광강도에 대한 HRP량의 검량선은 선형관계를 나타내었으며, 이러한 선형관계는 이온강도가 증가되어도 계속 유지되었다.

사 사

본 논문은 캔사스 주립대학교에서 연구한 것을 2008학년도 관동대학교 교내연구비 지원에 의하여 정리한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Borges, E. P. and Reis, B. F. (2005). An enzymatic flow-injection procedure with chemiluminescence detection for on-site determination of *L*-alanine in synthesis process. *Journal of Brazilian Chemical Society*, **16**, pp. 1226-1232.
- Cormier, M. J. and Prichard, P. M. (1968). An investigation of the mechanism of the luminescent peroxidation of luminol by stopped flow techniques. *Journal of Biological Chemistry*, **243**, pp. 4706-4714.
- Ii, M., Yoshida, H., Aramaki, Y., Masuya, H., Hada, T., Terada, M., Hatanaka, M., and Ichimori, Y. (1993). Improved enzyme immunoassay for human basic fibroblast growth factor using a new enhanced chemiluminescence system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **193**, pp. 540-545.
- Ilyina, A. D., Martínez Hernández, J. L., Mauricio Benavides, J. E., López Luján, B. H., Bogatecheva, E. S., Romero García, J., and Rodríguez Martínez, J. (2003). Determination of phenol using an enhanced chemiluminescent assay. *Luminescence*, **18**, pp. 31-36.
- Klibanov, A. M., Tu, T. M., and Scott, K. P. (1983). Peroxidase catalyzed removal of phenols from coal-conversion wastewaters. *Science*, **221**, pp. 259-261.
- Kricka, L. K. and Thorpe, G. H. G. (1983). Chemiluminescent and bioluminescent methods in analytical chemistry. *Analyst*, **108**, pp. 1274-1293.
- Li, W., Chen, K., Zhao, Y., Chen, L., Toselli, P., Chou, I. N., and Stone, P. (2004). Transcriptional perturbation of lysyl oxidase by cigarette smoke condensate in cultured lung fibroblasts. *Toxicologist*, **78**, pp. 262 (abstract).
- Motsenbocker, M. A. and Kondo, K. (1994). Improvement to enhanced horseradish peroxidase detection sensitivity. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, **9**, pp. 15-20.

- Nicell, J. A., Bewtra, J. K., Biswas, N., St. Pierre, C., and Taylor, K. E. (1993). Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compounds from aqueous solution. *Canadian Journal of Civil Engineering*, **20**, pp. 725-735.
- Osman, A. M., Zomer, G., Laane, C., and Hilhorst, R. (2000). Comparative studies of the chemiluminescent horseradish peroxidase-catalyzed peroxidation of acridan (GZ-11) and luminol reactions: effect of pH and scavengers of reactive oxygen species on the light intensity of these systems. *Luminescence*, **15**, pp. 189-197.
- Thorpe, G. H. G., Gillespie, E., Haggart, R., Kricka, L. J., and Whitehead, T. P. (1984). Analytical applications of bioluminescence and chemiluminescence. Academic, London.
- Thorpe, G. H. G., Kricka, L. J., Moseley, S. B., and Whitehead, T. P. (1985a). Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clinical Chemistry*, **31**, pp. 1335-1341.
- Thorpe, G. H. G., Kricka, L. J., Gillespie, E., Moseley, S., Amess, R., Baggett, N., and Whitehead, T. P. (1985b). Enhancement of the horseradish peroxidase-catalyzed chemiluminescent oxidation of cyclic diacyl hydrazide by 6-hydroxybenzothiazoles. *Analytical Biochemistry*, **145**, pp. 96-100.
- Thorpe, G. H. G. and Kricka, L. J. (1986). Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. *Methods Enzymol.*, **133**, pp. 331-353.
- Wu, Y., Taylor, K. E., Biswas, N., and Bewtra, J. K. (1997). Comparison of additives in the removal of phenolic compounds by peroxidase-catalyzed polymerization. *Water Research*, **31**, pp. 2699-2704.
- Yasaei, P. M., Yang, G. C., Warner, C. R., Daniels, D. H., and Kau, Y. (1996). Singlet oxygen oxidation of lipids resulting from photochemical sensitizers in presence of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **73**, pp. 1177-1181.
- Yeh, H. C. and Lin, W. Y. (2002). Enhanced chemiluminescence for the oxidation of luminol with m-chloroperoxybenzoic acid catalyzed by microperoxidase. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **372**, pp. 525-531.