



Prof. Dr. Kurt Kalcher
Institute of Chemistry - Analytical Chemistry
Karl-Franzens-University
Stremayrgasse 16/III
A-8010 GRAZ
AUSTRIA



phone: +43 316 380 5310
fax +43 316 380 9845
email: kurt.kalcher@uni-graz.at

Ref.: Report on the dissertation “Electrochemical Biosensors” of Mr. Vojtech Polan (supervisor prof. Ing. Karel Vytras, DrSc.), Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice

The thesis under consideration deals with the development of biosensors based on rhodium and its compounds as a mediator. Its structure comprises a general introduction (chapter 1), a theoretical part (chapter 2) giving an overview on biosensors and related topics, a practical part (chapter 3) describing mainly the enzymes used in the work, and a collection of nine papers which manifest the main part of the thesis.

Publication #1 describes glucose biosensors as screen-printed electrodes modified with glucose oxidase and rhodium oxides or a dimeric rhodium complex as mediator. Rhodium dioxide provided the best results. The sensor could be applied to the determination of glucose in instant tea by flow injection analysis.

Publication #2 deals with the same subject as a conference contribution.

Publication #3 investigates and compares RuO_2 , IrO_2 , PtO_2 and PdO with RuO_2 as mediators for glucose biosensors based on glucose oxidase. Surprisingly, as found in the publications before, RhO_2 but also some other platinum metal oxides show significant oxidation currents at low negative potentials, no or slightly negative currents at 0 V, and oxidation currents in the positive potential range.

Publication #4 studies rhodium dioxide as a mediator for glucose dehydrogenase immobilized by electro-polymerized m-phenylenediamine. The screen-printed sensors did not respond to ascorbic acid, uric acid or paracetamol as interferents; they could be applied to the determination of glucose in honey and syrup samples.

Publications #5 and #6 are conference contribution with a similar topic as publication #4.

Publication #7 describes an ethanol biosensor based on screen-printed carbon electrodes modified with alcohol dehydrogenase entrapped in electro-polymerized m-phenylenediamine and rhodium dioxide as a mediator. The sensor was applied to the determination of ethanol in alcoholic drinks (wine, whiskey, vodka).

Publication #8 is thematically based on #7, but investigates in detail the application of the ethanol sensor to rapid determinations of ethanol in different varieties of beers.

Publication #9 is a conference contribution screening various oxidases (glucose, galactose, choline and xanthine oxidase), immobilized in a Nafion membrane, by amperometric signal recording with the aid of rhodium dioxide as a mediator.

Assessment of the Work

- (i) The thesis is well presented and partly written in Czech language; many publications are in English. The structure is clear and well readable.
- (ii) The work gives a close and detailed study on the usefulness of rhodium dioxide as a mediator for oxidases and dehydrogenases; it provides new data and results which have a significant impact on the research topics under consideration.
- (iii) The methodology is unambiguous and in many respects innovative.
- (iv) The discussion of the data is scientifically profound.
- (v) The core of the thesis is made up by many publications.
- (vi) The candidate has performed considerable investigations on the use of rhodium compounds as mediators for oxidase and dehydrogenase sensors providing new data and results in this field. His scientific abilities are underlined by the publications integrated in the thesis; they comprise three publications in peer-reviewed journals, one contribution to a book, and five conference papers.

Based on these considerations, **I recommend the thesis for public defense.**



Graz, 28.08.2015

Prof. Dr. Kurt Kalcher
Head of work group
„Electroanalysis and Sensorics“

OPONENTSKÝ POSUDEK **na disertační práci**

Téma práce:
ELEKTROCHEMICKÉ BIOSENZORY

Autor:
Ing. Vojtěch POLAN

Školitel:
prof. Ing. Karel VYTRÁS, DrSc, Univerzita Pardubice

Oponent:
doc. Ing. Josef KELLNER, CSc. UO Brno

Disertační práce Ing. Vojtěcha Polana je zpracována s požadovanou kvalitou, naplňuje požadavky a určení disertační práce. Předložená práce psaná v českém jazyce se zabývá porovnáním využitelnosti testovaných sloučenin rhodia a redoxních enzymů v amperometrických biosenzorech a možnostmi jejich praktického využití při stanovení biologických látek v reálných vzorcích.

Jedná se o velice aktuální problematiku, která je v odborné veřejnosti hojně diskutována, avšak konkrétní praktické výstupy nejsou doposud plně využívány. Zpracovávané téma je velice rozsáhlé. Cíle oponované práce nejsou bohužel explicitně vyjádřeny ani rozčleněny na hlavní a doplňkové, jsou však uvedeny v anotaci práce a je možno konstatovat, že byly splněny. Autor v práci také nehodnotil dosažené výsledky práce z hlediska jejich možného jak teoretického, tak praktického přínosu.

Dizertant se v teoretické části zaměřil přednostně na témata, která souvisí s jeho experimentální částí práce. V analytické části je široce diskutována problematika biosenzorů, jako představitelů levných, rychlých, spolehlivých analytických metod, které zpravidla disponují i dostatečnou citlivostí a selektivitou stanovení. Vzhledem k jejich konstrukci je při jejich charakterizaci nezbytné posouzení také jejich reprodukovatelnosti, doby odezvy, ale také relaxačního času a životnosti.

V úvodu práce je diskutováno rozdělení biosenzorů podle biologické složky a podle typu fyzikálně chemického převodníku. Pozornost je zde věnována elektrochemickým biosenzorům, a zde nejvíce využívaným enzymovým elektrodám s amperometrickými

převodníky. Z obsahu zejména této části práce je patrné, že dizertant má přehled o řešené problematice a správně zde diskutuje vše podstatné. Nejrozsáhlejší kapitolou je kapitola 2.7.1, věnovaná uhlíkovým pastovým elektrodám. Tato část je vhodně doplněna odkazy na použitou literaturu, což bohužel chybí v části 2.8.1 až 2.8.3, věnované enzymům, kde jsem nenalezl žádný odkaz na literaturu. Kapitola 2.9 popisuje velmi podrobně imobilizaci enzymů, 2.10 obecnou charakteristiku mediátorů, a 2.11 se zabývá možnostmi aplikace uhlíkových nanotrubic při přípravě biosenzorů. V těchto částech práce je vidět, že dizertant prokazuje široké znalosti této problematiky.

Stěžejní částí práce je kapitola 3, Experimentální část, výsledky a diskuze, ve které je zahrnuto 9 publikací, řešících jednotlivé cíle práce. Jedná se o využití sloučenin rhodia jako mediátorů při stanovení glukózy a etanolu, výběru vhodné imobilizační techniky a použití enzymu glukóza oxidáza při konstrukci biosenzoru. Tři práce jsou věnovány biosenzorům využívající enzym glukóza dehydrogenáza a 2 práce řeší stanovení etanolu pomocí enzymu alkohol dehydrogenáza.

Pozitivně je možné hodnotit skutečnost, že doktorand řešil aktuální problematiku, využití biosenzorů při stanovení biologických látek v průtokové analýze. Oponovaná dizertační práce svým rozsahem, 96 stran naplňuje požadavky kladené na dizertační práci.

Doktorand postupně rozpracoval problémy, které si vytkl v cíli práce a tyto cíle zcela splnil:

- navrhl postup pro přípravu biosenzoru s obsahem oxidu rhodičitého jako mediátoru ;
- provedl optimalizaci vhodné imobilizační techniky enzymů;
- funkčnost připravených biosenzorů ověřil na modelových a reálných vzorcích.

Z hlediska formální správnosti nemám větších výhrad, práce má požadovanou délku, teoretická část spolu s experimentální částí je doplněna seznamem literárních zdrojů (s výjimkou kapitol 2.8.1 až 2.8.3) z nichž dizertant čerpal při studiu řešené problematiky. Jedná se převážně o literaturu z hodnotných zdrojů. Práce působí kompaktním dojmem jak pro stránce obsahové, tak i formální a grafické. V práci jsem našel minimum gramatických chyb. Nicméně v práci chybí seznam zkratk, chybí explicitně stanovené cíle práce a teoretické a praktické přínosy.

V rámci diskuze prosím dizertanta o odpověď na následující dotazy:

- 1) Jak je definována reprodukovatelnost a citlivost detektoru, LOD a LOQ?
- 2) Proč jste při výběru enzymů pro výrobu biosenzorů neuvažoval hydrolázy. Je jejich aplikace pro amperometrické detektory vyloučena?

3) Jak hodnotíte dosažené výsledky práce z hlediska jejich možného jak teoretického, tak praktického přínosu.

Je možno konstatovat, že dizertant disponuje dostatečným počtem publikací, jedná se jak o výstupy z konferencí, tak také články obsahující originální výsledky (peer-review) v recenzovaných časopisech.

Závěrem bych chtěl konstatovat, že předložená práce plně dokladuje schopnost autora samostatně řešit složité vědecké problémy, využívat statistické metody a výsledky prezentovat formou odborných článků. Student plně prokázal tvůrčí schopnost v dané oblasti výzkumu. Řešená problematika je aktuální a lze s jistotou prohlásit, že tato práce přispěla k rozvoji poznání elektrochemických biosenzorů.

Závěr

Posuzovaná disertační práce „Elektrochemické biosenzory“, kterou vypracoval student Ing. Vojtěch Polan, splňuje podmínky uvedené v § 47 odst. 4 zákona č.111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách).

Autor prokázal způsobilost k samostatné vědecké práci, má nezbytné teoretické vědomosti a odpovídající zkušenosti pro řešení dané problematiky a je schopen své myšlenky formulovat a vhodnou formou prezentovat.

Vzhledem k výše uvedenému doporučuji přijetí práce k obhajobě

V Brně dne 17. srpna 2015

doc. Ing. Josef Kellner, CSc.



Posudek disertační práce

Název práce: Elektrochemické biosenzory

Autor: Ing. Vojtěch Polan

Předložená disertační práce se zabývá vývojem a testováním enzymatických biosenzorů s přídavky různých mediátorů pro stanovení glukózy a etanolu. Teoretická část práce obsahuje všechny relevantní informace k pochopení experimentů prováděných autorem. Členění textu do kapitol je, až na jednu výjimku, přehledné a logické, úprava textu odpovídá příslušným technickým normám. V textu se nachází několik překlepů, zejména v cizích slovech, ale tento fakt nijak neruší celkový dobrý dojem z předložené disertační práce. V rešeršní části autor cituje celkem 112 původních prací. Experimentální a výsledková část je zpracována formou přiložených kopií 9 původních publikací autora, což je jedna z možných forem psaní disertačních prací na UPa. Tato část obsahuje 3 články v zahraničních recenzovaných časopisech, 1 kapitolu v zahraniční knize a 5 sborníkových prací. To jen dokládá, že vědecké zaměření autora a jeho výsledky jsou uznávány na mezinárodní úrovni (databáze Scopus uvádí celkem 7 citací jinými autory). K práci mám následující připomínky a dotazy:

1. Forma citace literatury v textu je stylisticky chybná. V případě citací více prací se píše [8-12] a nikoliv [8], [9], [10], [11], [12].
2. Opět stylistická záležitost...jednopísmenové předložky a spojky by neměly být na konci řádků (např. str. 15, str. 35 atd.)
3. K práci by měl být předložen seznam všech použitých zkratk, i těch v přiložených separátech. Čtenář musí složitě dohledávat v textu, co která zkratka v grafech znamená (CFRPD?).
4. Kapitola 2.11 o uhlíkových nanotrubicích (CNTs) mohla být součástí kapitoly 2.6.3 o pracovních elektrodách, protože CNTs se používají zejména pro modifikaci elektrod. Uvedením za kapitolou o mediátorech není moc logické.
5. Asi největší problém mám s grafickými závislostmi uvedených v přiložených publikacích. Je jasné, že aspoň polovina z nich již prošla řádným recenzním řízením, která jsou však vždy subjektivní. Tady je tedy můj subjektivní názor:
 - a. Grafické závislosti, např. proudu na vloženém potenciálu, pH nebo průtoku, obsahují kromě experimentálních bodů také křivky. U některých grafů se zdají

být jen pouhým propojením bodů, ale jiné (např. Figure 1, publikace 1; Obr. 2 v publikaci 2) se tváří jako křivky podle nějakého matematického modelu (křivka neprochází všemi body). Za jakých podmínek volil autor prosté spojení bodů nebo proložení matematickým modelem? Jaké modely byly použity?

- b. V publikacích 1-7 a 9 jsou ve všech grafech uvedeny pouze experimentální body bez uvedení informace, zda se jedná o jedno měření nebo „průměr“ z více měření. Pokud z více měření, potom by body měly také obsahovat aspoň standardní odchylku nebo konfidenční interval. V publikaci 8 je to tak, jak to má být, i když i zde chybí informace o počtu měření pro jeden kalibrační bod.

Vzhledem ke značné citlivosti některých metod uváděných autorem by bylo také vhodné zjistit limit kvantifikace pro vzorky a vliv matrice na stanovení (např. metodou standardního přídatku) a zjistit tak výtěžnost celého procesu. *Našla už nějaká Vámi publikovaná metoda praktického využití?*

Závěrem konstatuji, že autor prokázal tvůrčí schopnost nejen vědecky pracovat, ale také publikovat (7x jako první autor). Téma a výsledky práce jsou aktuální a více než zajímavé. Jazyková i formální úroveň splňuje požadavky na disertační práci. Uvedené připomínky slouží spíše jako rady pro budoucí kariéru a nijak nesnižují kvalitu této práce. Autor svým přístupem a výsledky dokázal, že je vhodným uchazečem pro udělení vědeckého titulu Ph.D.

Disertační práce doporučuji k obhajobě.

V Pardubicích 27. 08. 2015


doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Katedra analytické chemie