



Piotr Maciej Wojciechowski

Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2013.

© Copyright by Piotr Wojciechowski, Wrocław 2013

ISBN 978-83-938096-0-8

Słowo wstępne

Praca przedstawia wybór zagadnień związanych z wykorzystaniem narzędzi informatycznych w chemii, kolokwialnie określanych jako e-chemia. Przez analogię do terminów, w których litera ‘e’ podkreśla wkład rozwiązań elektronicznych, słowem ‘e-chemia’ definiuje się szeroki zbiór zagadnień określanych potocznie jako „elektroniczna chemia”. Termin „*E-chemistry*” został oficjalnie po raz pierwszy użyty w 2008 roku jako nazwa projektu wspieranego przez firmę Microsoft. Założeniem inicjatywy, opiewającej na sumę 999 649\$, była integracja sieci społecznościowej WEB 2.0 z istniejącą cyberinfrastrukturą, rozwiązaniami takimi jak eScience i eScholarship oraz aplikacjami typowo chemicznymi, jak Jaguar Quantum Mechanics oraz bazy chemiczne PubChem, CrystalEye, Pub3D, SPECTRaT, czy PubDock.

W niniejszym opracowaniu skupiono się na trzech najbardziej dynamicznie rozwijających się nurtach e-chemii, przechodząc od zagadnień czysto teoretycznych (chemii kwantowej) do przykładów praktycznych związanych z modelowaniem reakcji enzymatycznych (inżynieria chemiczna i biotechnologia). W końcowym rozdziale opisano zagadnienia związane z e-lerningiem i nauczaniem chemii poprzez sieć internet. Jako ilustrację poszczególnych zagadnień wykorzystano przykłady pochodzące z publikacji autora.

1 E-chemia – chemia kwantowa

1.1 Wstęp - metody *ab initio* oraz funkcjonału gęstości

Jednymi z bardziej zaawansowanych metod obliczeniowych stosowanych w chemii są metody *ab initio* oraz funkcjonału gęstości DFT (*Density Functional Theory*)*. Bazując na stałych fizycznych jak prędkość światła, stała Plancka oraz masy i ładunki elektronów oraz nukleonów pozwala między innymi określić strukturę elektronową oraz wyznaczyć geometrię cząsteczki przypisaną układowi o najniższej energii elektronowej [1]. Na podstawie macierzy stałych siłowych wyznaczanych podczas obliczeń teoretycznych, możliwe jest określenie właściwości spektroskopowych związków takich jak częstości i intensywności poszczególnych drgań normalnych oraz wyznaczenie rozkładu energii potencjalnej (PED) ortogonalnych drgań własnych.

Wyznaczenie struktury cząsteczkowej w wyniku optymalizacji geometrii metodami chemii teoretycznej sprowadza się do poszukiwania punktu stacjonarnego na hiperpowierzchni energii potencjalnej o najniższej wartości, który odpowiada (quasi-) równowagowej strukturze cząsteczki. Od strony obliczeniowej procedura optymalizacji geometrii sprowadza się do wielokrotnego wyznaczania pochodnych względem wszystkich współrzędnych jądrowych oraz iteracyjnego minimalizowania energii układu. Natomiast wyznaczenie wartościami własnymi macierzy drugich pochodnych (tzw. *hessianu*) pozwala na przewidywanie częstości drgań normalnych [2].

Przykładem metod *ab initio* są metody pola samouzgodnionego Hartree-Focka oraz rachunku zaburzeń Møllera-Plesseta. Metoda Hartree-Focka jest metodą wariacyjną pozwalającą na przybliżone rozwiązanie równania Schrödingera w oparciu o przybliżenie jednoelektrodowe. Metoda Hartree-Focka wymaga rozwiązania szeregu układów nieliniowych równań różniczkowo-całkowych, dlatego w praktyce stosuje się często przybliżenie algebraiczne SCF LCAO MO (ang. *Self-Consistent Field Linear Combination of Atomic Orbitals – Molecular Orbitals*), która upraszcza schemat obliczeń i jest połączeniem metody pola samouzgodnionego z metodą liniowych kombinacji orbitali atomowych. W przypadku rachunku zaburzeń Møllera-Plesseta, uwzględnia się funkcje jednowyznacznikowe i współczynniki kombinacji liniowej, wyznaczone jako kolejne

* W chemii obliczeniowej stosuje się także metody półempiryczne oraz metody mechaniki molekularnej, które za cenę jakości obliczeń, pozwalają na opisanie większych układów atomów i cząsteczek.

poprawki do rozwiązania w zerowym rzędzie na podstawie równań szeregu perturbacyjnego.

Metody DFT, są zaliczane do osobnej klasy metod kwantowo-mechanicznych, gdyż większość wykorzystywanych w nich funkcjonałów korelacyjno-wymiennych dobierana jest tak, by najlepiej odtworzyć dane eksperymentalne. Metody te uwzględniają korelację pomiędzy elektronami i przyjmują, iż wszystkie własności układu kwantowego w stanie stacjonarnym są jednoznacznie funkcjami gęstości elektronowej stanu podstawowego. Jedną z częściej stosowanych metod DFT jest przybliżenie hybrydowe B3LYP [3, 4], którego geneza związana jest z takim doбором uwzględnianych potencjałów, aby uzyskać najlepszą zgodność obliczeń z eksperymentem. Akronim będący nazwą metody B3LYP (*Becke 3-term correlation functional; Lee, Yang, and Parr exchange functional*) wiąże się z uwzględnieniem w wyrażeniu na potencjał korelacyjno-wymienny energii wymiennej Beckego [3] z poprawkami gradientowymi oraz członu korelacyjnego Lee-Younga-Parra [4]. Swoją popularność metody DFT zawdzięczają „ekonomi” obliczeń, gdyż na ogół przy kosztach obliczeń nieznacznie tylko przekraczających obliczenia wykonywane klasyczną metodą Hartree-Focka, dostarczają znacznie dokładniejszych wyników obliczeń. Warto podkreślić, iż metody DFT w przeciwieństwie do metod *ab initio*, mogą być z powodzeniem stosowane do modelowania układów o niskiej różnicy pomiędzy orbitalami HOMO i LUMO [2], co okazało się kluczowym aspektem przy modelowaniu właściwości polimerów przewodzących stworzonych na bazie domieszkowanej aniliny [5, 6].*

1.2 Anilina i jej pochodne jako modelowe cząsteczki w chemii teoretycznej

Anilina wraz z jej halogenopochodnymi jest modelowym układem umożliwiającymi analizę wpływu rodzaju podstawników na geometrię i rozkład gęstości elektronowej w pierścieniu aromatycznym, określenie relacji donor-akceptor gęstości elektronowej w cząsteczce, czy wpływu podstawnika na zmiany w widmie harmocznym [7].

Geometria i struktura elektronowa aniliny oraz jej halogenopochodnych są wynikiem kompozycji kilku typów oddziaływań. Grupa aminowa w cząsteczce aniliny,

* Wybór metody B3LYP okazał się także istotny przy modelowaniu właściwości rodnika kationowego aniliny. Wartość spinu całkowitego S^2 dla obliczeń metodą otwartopowłokową UB3LYP wynosiła 0,7503 co znakomicie odpowiadało spodziewanej dla kationu wartości 0,7500. Natomiast dla metody otwartopowłokowej UMP2 wartość S^2 wynosiła 0,8319, co odpowiada 11% zanieczyszczeniu spinowemu w metodzie MP2 [33].

zgodnie z dodatnim efektem mezomerycznym, powoduje zwiększenie gęstości elektronowej pozycjach *para* i *orto* pierścienia aromatycznego, promując substytucję elektrofilową w tych miejscach. Odmienne konsekwencje wywołuje wprowadzenie atomu halogenu, który poprzez wiązanie σ „wyciąga” gęstość elektronową (efekt indukcyjny) przy jednoczesnym zwiększeniu gęstości elektronowej π nad układem aromatycznym (efekt rezonansowy). Nie bez znaczenia pozostaje także oddziaływanie wolnej pary elektronowej atomu azotu z chmurą elektronową nad pierścieniem aromatycznym, które jest odpowiedzialne za stabilizację cząsteczki [8].

Anilina ma szerokie zastosowanie w przemyśle chemicznym*, kosmetycznym, gumowym, w produkcji środków ochrony roślin, pigmentów, barwników oraz materiałów wybuchowych [9, 10], a także ciekłych kryształów [11]. Usieciowana forma aniliny – polianilina (PANI) wykorzystywana jest w procesie wytwarzania kompozytów [12], jako inhibitor korozji [13], w optyce nieliniowej [14] oraz przy produkcji nanocząsteczek, paneli słonecznych [15] oraz polimerów przewodzących [16]. Szczególne zastosowanie znalazła w przemyśle farmaceutycznym: jednym z najstarszych syntetycznych środków przeciwbólowych stosowanych w medycynie od 1887 roku jest pochodna aniliny *fenacetyna* [9]. Obecnie *fenacetyna* została zastąpiona przez inną pochodną aniliny, *paracetamol*, który wykazuje działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne. Pochodne anilinowe aniliny, jak *diloksanid* stosowane są jako leki przeciwpierwotniakowe, a anilidowe pochodne podstawione w pozycjach 2,4,6-pierścienia stosowane są jako leki miejscowo znieczulające (*bupiwakaina*, *lidokaina*, *mepiwakaina*, *prilokaina*, *tolikaina*), leki antyarytmiczne (*eukainid*, *lorkainid*, *tokainid*) oraz środki przeciwswiądowe działające na pasożyty skóry (*crotamiton*). Bromopochodne aniliny (*ambroksol*, *bromheksyna*, *deflegmin*, *flavamed*, *mucosolvan*) stosowane są jako leki mukolityczne oraz preparaty o działaniu wykrztuśnym. Halogenopochodne aniliny wykorzystuje się także jako herbicydy i pestycydy, oraz jako substancje o działaniu przeciwbakteryjnym [9, 17].

Szczegółowa analiza zależności związanych z wymienionymi na wstępie oddziaływaniami pozwala na charakterystykę nie tylko samej cząsteczki aniliny, ale także szeregu pochodnych aniliny. Daje również możliwość prognozowania wpływu podstawników na właściwości związków aromatycznych i projektowanie nowych materiałów, takich jak polimery przewodzące [16].

* Pod względem tonażu, największe zapotrzebowanie przemysłu związane jest z wykorzystywaniem aniliny jako substratu w procesie przemysłowej syntezy poliuretanu.

1.3 Obliczenia

Obliczenia kwantowo-mechaniczne przedstawione w rozdziale wykonano stosując metodę funkcjonału gęstości DFT/B3LYP [3, 4] w rozszerzonej bazie funkcyjnej 6-311++G(df,pd). Wybrana baza triple ζ uwzględnia funkcje polaryzacyjne p,d dla atomów wodoru; funkcje polaryzacyjne d,f dla atomów C, N i halogenów oraz rozszerza funkcje dyfuzyjne na wszystkich atomach* [18, 19]. Pełną optymalizację geometrii, obliczenie harmonicznych i anharmonicznych częstości, wyznaczenie intensywności[†] w widmie w podczerwieni oraz określenie aktywności ramanowskich przeprowadzono korzystając z pakietu GAUSSIAN [20]. Podczas procedury optymalizacji geometrii, została użyta opcja SCF=verytight zawężająca narzucone kryteria zbieżności. W pracy użyto dwóch współczynników skalujących dla częstości harmonicznych: dla drgań rozciągających $\nu(\text{C-H})$ oraz $\nu(\text{N-H})$ współczynnika skalującego równego 0,958; natomiast dla pozostałych drgań normalnych współczynnika 0,983. Analogicznych współczynników skalujących użyto przy skalowaniu częstości dla cząsteczek fenolu [21] oraz 5-bromo-2-nitropyridyny [22, 23]. Liczby falowe w przybliżeniu anharmonicznym zostały wyznaczone w oparciu o algorytm opracowany przez Vincenzo Barone [24, 25] zaimplementowany w programie GAUSSIAN 09. Procentowy rozkład energii potencjalnej (PED) obliczono w programie BALGA [26, 27] na podstawie macierzy stałych siłowych generowanej przez program GAUSSIAN. Ilustrację drgań normalnych wraz z wektorami wychyleń atomów wykonano w programie Chemcraft [28]. Analizę naturalnych orbitali wiązań NBO (*Natural Bond Orbital*) [29], wyznaczenie naturalnych ładunków oraz wyznaczenie energii oddziaływania donor-akceptor wykonano w odrębnym programie NBO 5.0 [30]. Rzędowość wiązań wyznaczono na podstawie procentowego udziału poszczególnych struktur rezonansowych (polecenie 'nrt' w programie NBO).

Należy podkreślić, że program GAUSSIAN domyślnie w pliku wynikowym podaje *de facto* aktywności ramanowskie (a nie intensywności ramanowskie). Intensywności ramanowskie, odpowiadające intensywnościom absolutnym w widmie doświadczalnym Ramana, można wyznaczyć w oparciu długość o fali wiązki wzbudzającej lasera użytego przy pomiarze, na podstawie wzoru [31, 32]:

* Wybór większej bazy funkcyjnej okazał się istotny już na etapie poprawnego odtworzenia geometrii cząsteczek. Optymalizacja geometrii cząsteczki aniliny metodami HF, MP2 i B3LYP w bazie minimalnej prowadzi do uzyskania płaskiej cząsteczki. W rzeczywistości grupa aminowa wykazuje piramidalizację, a efekt ten jest odtwarzany poprawnie w obliczeniach dopiero po rozbudowaniu bazy funkcyjnej.

[†] Począwszy od wersji D.01 pakietu GAUSSIAN możliwe jest wyznaczenie intensywności pasm w teoretycznym widmie IR zarówno w oparciu o przybliżenie harmoniczne, jak i anharmoniczne.

$$I_i^R = C \cdot (\nu_0 - \nu_i)^4 \cdot \nu_i^{-1} \cdot B_i^{-1} \cdot S_i^R \quad (1)$$

Gdzie ν_i jest teoretyczną liczbą falową (cm^{-1}) odpowiadającą drganiu własnemu Q_i ; S_i^R jest aktywnością ramanowską drgania własnego Q_i ; ν_0 jest długością wzbudzającą fali lasera; C współczynnikiem skalującym (w pracy przyjęto $C = 10^{-12}$); a B_i współczynnikiem temperaturowym, wyrażonym jako rozkład Boltzmana:

$$B_i = 1 - \exp\left(-\frac{h \cdot \nu_i \cdot c}{k \cdot T}\right) \quad (2)$$

Symbole h , k , c , i T w powyższych równaniach oznaczają stałą Plancka, stałą Boltzmana, prędkość światła oraz temperaturę wyrażoną w stopniach Kelvina. Teoretyczne intensywności Ramanowskie wyrażone są w skali umownej (bez jednostek). Widmo teoretyczne Ramana i w podczerwieni rysowano przyjmując szerokość połówkową HWHH (*half-width at half-height*) równą 3 cm^{-1} oraz stosując rozkład Cauchy'ego-Lorentza przy „wygładzaniu” funkcji. W pracy przyjęto $\nu_0 = 15822.8 \text{ cm}^{-1}$, co odpowiada długości fali 632 nm lasera helowo-neonowego (He-Ne) użytego przy pomiarach widm Ramana*.

1.4 Część doświadczalna

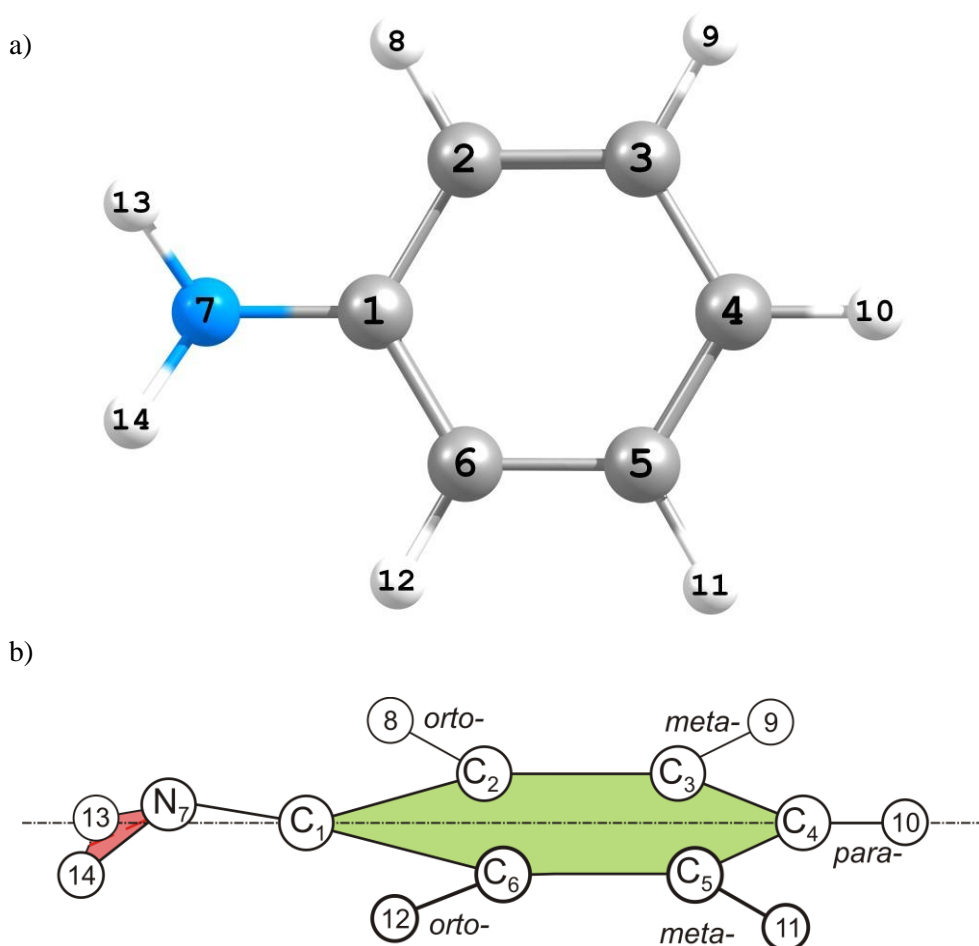
Widma ramanowskie w zakresie $4000\text{-}50 \text{ cm}^{-1}$ z rozdzielczością spektralną 2 cm^{-1} zarejestrowano na spektrometrze Horiba Jobin Yvon HR800 w Laboratorium Materiałów Zol-Żelowych i Nanotechnologii Dolnośląskiego Centrum Zaawansowanych Technologii we Wrocławiu. Pomiar spektroskopowy w zakresie dalekiej podczerwieni zostały wykonywane przy użyciu spektrometru Perkin Elmer FTIR-2000 oraz spektrometru Perkin Elmer 1600 w Centralnym Laboratorium Analizy Instrumentalnej Politechniki Wrocławskiej. Pomiar IR wykonano w zakresie $4000\text{-}50 \text{ cm}^{-1}$ z rozdzielczością 4 cm^{-1} . Dodatkowe widmo ATR-FT-IR w zakresie poniżej 400 cm^{-1} dla 2,3,4,5,6-pentafluoroaniliny zostało zarejestrowane dla warstwy związku naniesionej na diamentową powierzchnię w spektrofotometrze Bruker Vertex 70v FT-IR w Zintegrowanym Wydziałowym Laboratorium Inżynierii i Badania Materiałów Zaawansowanych. W badaniach użyto odczynników zakupionych w firmie Sigma-Aldrich o czystości $> 99\%$.

* W programie GAUSSIAN można wyznaczyć analitycznie aktywności optyczne Ramana, wykonując obliczenia z komendami $\text{FREQ}=\text{ROA}$ i $\text{CPHF}=\text{RDFREQ}$ oraz podając na końcu pliku wejściowego odpowiednią częstotliwość światła (np. 632nm).

1.5 Wyniki i dyskusja

1.5.1 Parametry geometryczne

Z tabeli 1 przedstawiono zestawienie wybranych parametrów geometrycznych wyznaczonych dla aniliny (A), kationu rodnikowego aniliny $C_6H_5NH_2^+$ (A^+), 2-fluoroaniliny (2FA), 3-fluoroaniliny (3FA), 4-fluoroaniliny (4FA), 4-chloroaniliny (4ClA), 4-bromoaniliny (4BrA) oraz 2,3,4,5,6-pentafluoroaniliny (PFA) [7, 33, 34, 35]. Pełną optymalizację geometrii wykonano metodą B3LYP w bazie funkcyjnej 6-311++G(*df,pd*) zawiązując kryteria zbieżności w programie GAUSSIAN opcją SCF=verytight. Na rysunku 1 przedstawiono numerację atomów dla cząsteczki aniliny oraz jej pochodnych omawianych w rozdziale.



Rys. 1. a) numeracja atomów w cząsteczce aniliny;
b) piramidalizacja grupy $-NH_2$ (opis w tekście).

Tabela 1. Zestawienie długości wiązań (Å) oraz kątów (°) dla cząsteczek aniliny (A), kationu rodnikowego aniliny $C_6H_5NH_2^+$ (A^+), 2-fluoroaniliny (2FA), 3-fluoroaniliny (3FA), 4-fluoroaniliny (4FA), 4-chloroaniliny (4ClA), 4-bromoaniliny (4BrA) oraz 2,3,4,5,6-pentafluoroaniliny (PFA) wyznaczone metodą B3LYP w bazie funkcyjnej 6-311++G(df,pd).

Parametr	A	A^+	2FA	3FA	4FA	4ClA ^e	4BrA ^e	PFA
grupa symetrii	C_s	C_{2v}	C_1	C_1	C_s	C_s	C_s	C_s
C_1-N_7	1,394	1,332	1,387	1,390	1,397	1,392	1,391	1,379
N_7-H_{13}	1,008	1,012	1,008	1,007	1,008	1,008	1,008	1,007
N_7-H_{14}	1,008	1,012	1,007	1,007	1,008	1,008	1,008	1,007
C_1-C_2	1,401	1,432	1,398	1,401	1,400	1,400	1,400	1,397
C_2-C_3	1,389	1,368	1,379	1,382	1,390	1,388	1,388	1,386
C_3-C_4	1,392	1,410	1,393	1,384	1,383	1,388	1,389	1,390
C_4-C_5	1,392	1,410	1,391	1,393	1,383	1,388	1,389	1,390
C_5-C_6	1,389	1,368	1,390	1,388	1,390	1,388	1,388	1,386
C_1-C_6	1,401	1,432	1,400	1,402	1,400	1,400	1,400	1,397
$C_2-X_8^a$	1,084	1,082	1,361	1,083	1,084	1,084	1,084	1,345
$C_3-X_9^a$	1,084	1,081	1,082	1,352	1,082	1,082	1,082	1,333
$C_4-X_{10}^a$	1,082	1,082	1,082	1,081	1,356	1,759	1,913	1,335
$C_5-X_{11}^a$	1,084	1,081	1,083	1,083	1,082	1,082	1,082	1,333
$C_6-X_{12}^a$	1,084	1,082	1,084	1,084	1,084	1,084	1,084	1,345
$X_8 \cdots H_{13}^a$	2,427	2,413 ^e	2,367	2,456	2,433	2,434	2,435	2,437
$\angle C_1-C_2-C_3$	120,5	119,4	123,2	119,0	120,9	120,9	120,9	122,2
$\angle C_2-C_3-C_4$	120,8	120,2	119,1	123,2	119,1	119,7	119,8	120,0
$\angle C_3-C_4-C_5$	118,9	120,9	119,3	117,2	121,4	120,3	120,3	119,1
$\angle C_2-C_1-C_6$	118,6	120,1	116,7	118,8	118,4	118,3	118,3	116,5
$\angle C_1-C_2-X_8^a$	119,5	119,4	117,2	121,4	119,6	119,7	119,7	118,3
$\angle C_4-C_3-X_9^a$	120,0	119,7	121,9	118,8	119,8	120,1	120,3	120,0
$\angle C_3-C_4-X_{10}^a$	120,6	119,6	120,0	120,4	119,3	119,8	119,9	120,4
$\angle C_1-N_7-H_{13}$	116,2	121,6	116,2	116,8	115,6	116,4	116,5	116,8
$\angle H_{13}-N_7-H_{14}$	112,8	116,8	113,9	113,3	112,3	112,9	113,0	115,1
$\angle \gamma^b$	35,5	0	29,1	28,6	36,0	34,1	33,7	30,3
$\angle \tau^c$	2,2	0	2,9	2,2	2,4	2,3	2,2	2,7
$C_1 \cdots C_4$	2,812	2,779	2,822	2,821	2,783	2,797	2,797	2,825
$C_2 \cdots C_5$	2,775	2,481	2,744	2,779	2,781	2,778	2,779	2,375
$C_3 \cdots C_6$	2,775	2,453	2,783	2,748	2,781	2,778	2,779	2,396
HOMA ^{d,e}	0,98468	0,75827	0,98475	0,98134	0,98531	0,98763	0,98514	0,99313

^a X = H, F, Cl lub Br w zależności od cząsteczki,

^b kąt dwuścienny pomiędzy płaszczyzną NH_2 oraz płaszczyzną pierścienia aromatycznego,

^c kąt płaski pomiędzy wiązaniem C_1-N_7 oraz osią przechodzącą przez atomy C_1-C_4 ,

^d indeks aromatyczności HOMA [36],

^e dane niepublikowane.

Struktura elektronowa i geometryczna aniliny i jej pochodnych jest wynikiem kompozycji kilku oddziaływań. Generalnie obecność grupy aminowej powoduje zwiększenie gęstości elektronowej na atomach węgla w pozycjach *orto* i *para*, czego efektem jest promocja substytucji elektrofilowej w tych miejscach. Jednocześnie atomy halogenów mają tendencję do wyciągania gęstości elektronowej z pierścienia poprzez wiązanie σ (efekt indukcyjny), przy jednoczesnym przekazywaniu części gęstości elektronowej poprzez układ orbitali π (dodatni efekt mezomeryczny).

Charakterystyczną właściwością geometryczną aniliny i jej halogeno pochodnych jest piramidalna konformacja grupy aminowej. Należy jednak podkreślić, że stopień piramidalizacji grupy $-\text{NH}_2$ wyznaczony eksperymentalnie zależy od zastosowanej metody pomiarowej. Pomiaru mikrofalowe wykonane dla cząsteczki aniliny wykazały, iż kąt dwuścienny γ pomiędzy płaszczyzną określoną przez układ aromatyczny (*kolor zielony na rysunku 1b*), a płaszczyzną grupy aminowej (*kolor czerwony na rysunku 1b*) wynosi $37 \pm 2^\circ$ [37], podczas gdy pomiary wykorzystujące rezonans fluorescencyjny [38] oraz pomiary w dalekiej podczerwieni [39], wykazały iż kąt ten jest nieznacznie wyższy i wynosi $42 \pm 1^\circ$. Podobną zależność zaobserwowano dla cząsteczki 4FA, gdzie pomiary w dalekiej podczerwieni dały nieznacznie większą wartość kąta dwuściennego γ ($42,7^\circ$) [40]. Opisywana piramidalizacja grupy aminowej jest wynikiem kompozycji dwóch przeciwstawnych oddziaływań. Oddziaływania stabilizacyjnego pomiędzy wolną parą elektronową atomu azotu (LP_N), a gęstością π -elektronową nad układem aromatycznym oraz tendencją atomu azotu do tworzenia układu charakterystycznego dla tetraedrycznej hybrydyzacji sp^3 . Silniejsze oddziaływanie wolnej pary elektronowej atomu azotu z chmurą π -elektronową skutkuje „spłaszczeniem” grupy aminowej. W przypadku 4FA aniliny, dochodzi do przekazania gęstości elektronowej z orbitalu p_z wolnej pary elektronowej atomu fluoru, skutkująca osłabieniem oddziaływania $\text{LP}_\text{N}-\pi$ i zwiększeniem piramidalizacji grupy $-\text{NH}_2$ [7]*. Odwrotny efekt obserwowany jest w przypadku pozostałych halogeno pochodnych aniliny, gdzie dochodzi do zmniejszenia wartości kąta γ w stosunku do aniliny (tabela 1). Drugim charakterystycznym parametrem opisującym geometrię grupy aminowej, jest kąt τ , definiujący odchylenie atomu azotu nad płaszczyznę opisaną przez układ atomów pierścienia aromatycznego (w anilinie i jej halogenopochodnych, zarówno atom azotu, jak i dwa połączone z nim atomy wodoru znajdują się poza płaszczyzną układu aromatycznego). Dla aniliny i jej fluoro pochodnych

* Oddziaływania te zostały szczegółowo opisane w podrozdziale rozdziale poświęconym analizie NBO.

wartość kąta τ zawiera się w przedziale od $2,2^\circ$ do $2,9^\circ$. Ponadprzeciętna wartość kąta τ obserwowana dla 2FA związana jest ze „skręceniem” grupy aminowej względem płaszczyzny układu aromatycznego, co opisuje różna wartość kątów płaskich przy wiązaniu N-C1 ($\angle N7-C1-C2 = 120,46^\circ$ i $\angle N7-C1-C6 = 122,8^\circ$).

W przeciwieństwie do aniliny i jej halogeno pochodnych, kation rodnikowy aniliny w podstawowym stanie elektronowym (2B_1) jest płaski. Wszystkie atomy leżą na jednej płaszczyźnie, dzięki czemu kation rodnikowy aniliny posiada najwyższą grupę symetrii ze wszystkich omawianych cząsteczek (C_{2v}). Skrócenie wiązania C₁-N do wartości $1,322\text{Å}$, sugeruje tworzenie się częściowo podwójnego wiązania CN, powstającego podczas jonizacji aniliny. Znajduje to potwierdzenie w danych eksperymentalnych dla kationu aniliny [41] oraz analizie NBO, zgodnie z którą indeks Wiberga [42] rzędowości wiązania CN wynosi $1,1364$. Zgodnie z tabelą 1, wyznaczone kąty $\angle C1-N7-H13$ oraz $\angle H13-N7-H14$ dla kationu osiągają największe wartości ze wszystkich opisywanych związków. Związane jest to z tworzeniem płaskiego hybrydu na atomie azotu N7. Hybryd na atomie azotu w wiązaniu CN ma hybrydyzację $sp^{1,46}$, która zgodnie z konwencją notacji NBO, ma w 41% charakter *s*, a w 59% charakter *p*. Deficyt jednego elektronu w kationie rzutuje także na strukturę pierścienia i tworzenie się formy analogicznej dla chinonów (*quinone structure*), z dwoma wiązaniami podwójnymi w pierścieniu – skróceniu ulegają wiązania C2-C3 oraz C5-C6, równoległe do osi symetrii kationu przechodzącej przez atomy C1, C4 oraz N7.

Jak pokazano na przykładzie mono-fluoro pochodnych aniliny [8, 34], podstawienie atomu fluoru powoduje „wyciąganie” σ gęstości elektronowej z pierścienia aromatycznego, co przejawia się zwiększeniem kąta $\angle C-C_F-C$ oraz skróceniem długości wiązań C-C_F w miejscu podstawienia atomu fluoru (efekt indukcyjny). W przypadku 5FA obserwujemy skrócenie wszystkich wiązań C-C, w stosunku do aniliny [35], dlatego 5FA możemy nazwać najbardziej „zwartą” cząsteczką*. Ponadto zwiększenie wartości pięciu kątów $\angle C-C_F-C$, w naturalny sposób skutkuje zmniejszeniem „ostatniego” kąta płaskiego w pierścieniu $\angle C-C_N-C$ przy atomie azotu oraz najmniejszą wartością kąta $\angle C2-C1-C6$ dla 5FA wśród wszystkich omawianych w pracy cząsteczek ($116,52^\circ$).

Aromatyczność aniliny i jej pochodnych może być w prosty sposób opisana poprzez jednoparametrowy indeks aromatyczności HOMA (*Harmonic Oscillator Model of*

* Jeżeli wyznaczmy powierzchnię sześciokąta, którego wierzchołkami będzie sześć atomów węgla tworzących pierścień benzenowy, to powierzchnia tak zdefiniowanego układu w przypadku 5FA wynosi $5,022\text{Å}^2$. W przypadku aniliny wartość ta wynosi $5,046\text{Å}^2$, a dla cząsteczki benzenu $5,035\text{Å}^2$.

Aromaticity) [36]. Dla związków niearomatycznych wartości indeksu HOMA wynoszą około zera i wzrastają do jedności dla związków w pełni aromatycznych. Zgodnie z modelem, wartość indeksu aromatyczności jest określona zależnością:

$$\text{HOMA} = 1 - \frac{\alpha}{n} \sum_i (R_{opt} - R_i)^2 \quad (3)$$

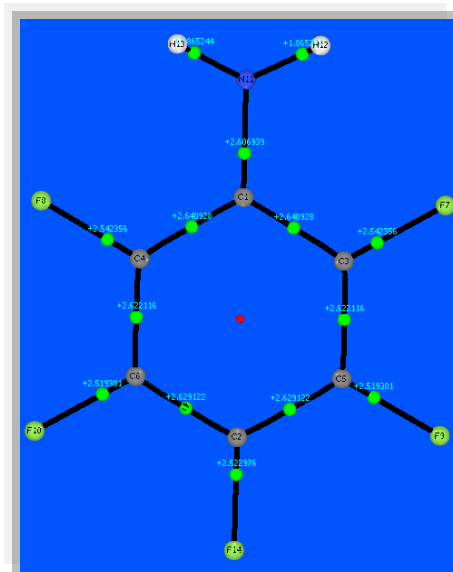
gdzie wskaźnik i numeruje wiązania w układzie, α jest współczynnikiem normalizującym, n ilością rozpatrywanych wiązań, R_{opt} jest optymalną długością wiązania, a R_i jest długością danego wiązania i w układzie. Dla wiązań C-C tworzących pierścień układu aromatycznego w cząsteczce aniliny, przyjęto parametry modelu równe $\alpha = 257,7$; $R_{opt} = 1.388 \text{ \AA}$ oraz $n = 6$ [36c]. Dla rozpatrywanych związków indeks aromatyczności wzrasta w następującym porządku: A^+ (0,7583) < 3FA (0,9813) < A (0,9846) < 2FA (0,9847) < 4FA (0,9853) < 4BrA (0,9851) < 4ClA (0,9876) < PFA (0,9931). Skrajnie niska wartość indeksu HOMA dla kationu aniliny A^+ , potwierdza brak aromatyczności kationu rodnikowego, co spowodowane jest deficytem elektronu w stosunku do układu spełniającego regułę Hückla oraz tworzeniem formy charakterystycznej dla chinonu. Nie powinna być także zaskoczeniem najwyższa wartość indeksu aromatyczności przypisana dla PFA, gdyż obecność aż pięciu atomów fluoru powoduje największy wzrost π gęstości elektronowej nad pierścieniem tworzącym układ aromatyczny. Zaskoczeniem może być natomiast niższa niż dla aniliny wartość indeksu aromatyczności HOMA wyznaczona dla 3FA. Należy jednak podkreślić, że HOMA jest indeksem geometrycznym bazującym na długości wiązań pomiędzy atomami tworzącymi układ aromatyczny. W przypadku 3FA obserwujemy największą deformację pierścienia o czym świadczy nie tylko największe odchylenie długości wiązań C-C od średniej wartości oczekiwanej dla układu aromatycznego (1.388 Å), ale także stosunkowo wysoka różnica pomiędzy przekątnymi pierścienia aromatycznego $C_1 \cdots C_4$ oraz $C_3 \cdots C_6$, która wynosi około 0,04 Å.

Deficyt σ gęstości elektronowej w pierścieniu aromatycznym rzutuje na skrócenie długości wiązania C-N. Jak wspomniano najkrótsze wiązanie C-N obserwowane jest dla rodnika kationowego, gdzie obserwowane jest tworzenie częściowo podwójnego wiązania. Znaczne skrócenia wiązania C-N, obserwowane jest także dla PFA oraz 2FA. W przypadku PFA skrócenie długości wiązania C-N o około 0,015 Å w stosunku do aniliny, związane jest ze skumulowaną siłą pięciu podstawników fluorowych „wyciągających” gęstość σ elektronową z pierścienia. Natomiast w przypadku 2FA, dochodzi do największego skrócenia wiązania w stosunku do wszystkich mono halogeno

pochodnych, co związane jest z bezpośrednim sąsiedztwem fluoru w stosunku do wiązania C-N. Interesujące jest wydłużenie wiązania C-N dla 4FA oraz 4BrA w odniesieniu do A. W 4FA dochodzi do superpozycji silnie elektroujemnego atomu fluoru w stosunku do grupy aminowej, dyskutowanej w części poświęconej analizie NBO. Przeciwnie (symetryczne) rozmieszczenie dwóch grup, mocno konkurujących o gęstość σ elektronową, skutkuje także najmniejszą geometryczną deformacją pierścienia aromatycznego, co widać po zbliżonych wartościach przekątnych $C_1\cdots C_4$, $(C_2\cdots C_5)$ oraz $C_3\cdots C_6$ (Tabela 1). Natomiast w przypadku 4BrA atom bromu okazuje się posiadać dodatni ładunek elektronowy, a więc jest on *de facto* donorem, a nie akceptorem gęstości elektronowej, w przeciwieństwie do pozostałych halogenów. Zmiany długości wiązania C-N są obserwowane poprzez przesunięcie częstości drgania rozciągającego $\nu(\text{CN})^*$, który to efekt szczegółowo omawiany jest przy opisie widm harmonicznym.

Opisując parametry geometryczne pochodnych aniliny warto zwrócić uwagę na ponadprzeciętną wartość kąta H13-N7-H14 równą $115,1^\circ$ obserwowaną dla PFA. Wartość ta jest około $2,3^\circ$ wyższa niż w przypadku aniliny i jest zbliżona do wartości przedstawionej dla 2,3,6-tri fluoroaniliny ($114,8^\circ$) [43]. Podwyższona wartość kąta H13-N7-H14 w PFA jest wynikiem dwóch przyciągających oddziaływań elektrostatycznych, pomiędzy atomami F8 i H14 oraz F12 i H13 i związana jest z oddziaływaniem kulombowskim pomiędzy atomami wodoru o dodatnim ładunku ($0,396e$) oraz atomami fluoru o ładunku ujemnym ($-0,337e$). Chociaż odległości F8 \cdots H14 oraz F12 \cdots H13 ($2,437 \text{ \AA}$) są krótsze o około $0,23 \text{ \AA}$, niż suma promieni *van der Waalsa* dla atomów wodoru i fluoru ($1,20 + 1,47 \text{ \AA}$), jak pokazano w pracy [34], powyższe oddziaływanie wewnątrzcząsteczkowe jest bardzo słabe. Należy podkreślić, iż odległości N7 \cdots F8 oraz N7 \cdots F12 ($2,760 \text{ \AA}$) są krótsze o około $0,41 \text{ \AA}$, od sumy promieni *van der Waalsa* dla atomów azotu i fluoru, jednak zgodnie z aktualną rekomendacją IUPAC [44], omawiane oddziaływanie wewnątrz cząsteczkowe nie może być sklasyfikowane jako wewnątrz cząsteczkowe wiązanie wodorowe. O braku wiązania wodorowego świadczy między innymi brak punktów krytycznych (3, -1) pomiędzy atomami F8 i H14 oraz F12 i H13 [44, Footnote F9], co przedstawiono na rysunku 2.

* W przypadku skrócenia (i wzmocnienia) wiązania dochodzi do przesunięcia częstości drgania rozciągającego w kierunku wyższych częstości (*blue shift*). Natomiast w przypadku wydłużenia (i osłabienia) danego wiązania dochodzi do przesunięcia częstości drgania rozciągającego w kierunku niższych częstości (*ang. red shift*).



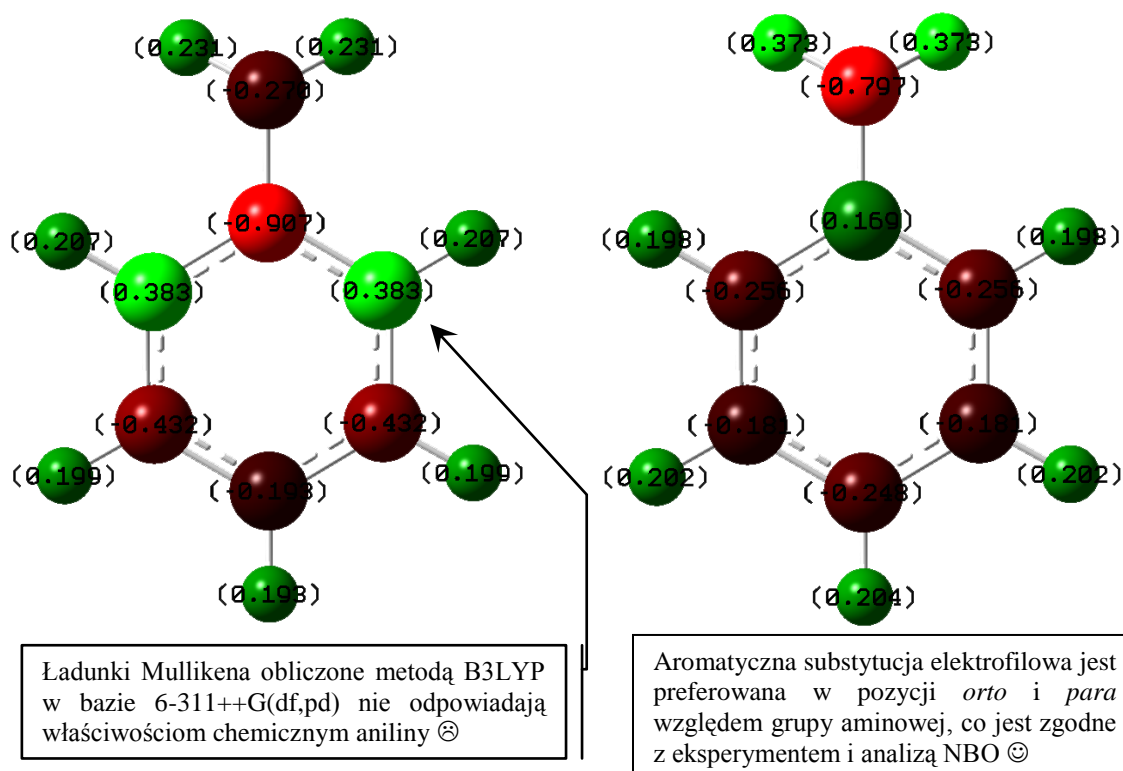
Rys. 2. Punkty krytyczne wyznaczone w oparciu o topologię gęstości elektronowej dla PFA [45].

1.5.2 Analiza naturalnych orbitali wiązań NBO

Już pierwsze obliczenia wykonane metodami MP2 i B3LYP w stosunkowo dużej bazie 6-311++G(*df*, *pd*) pokazały iż wyznaczone ładunki Mullikena [46] są niewiarygodne, podczas gdy naturalne ładunki wyznaczone metodą NBO [47] opisują cząsteczkę aniliny zgodnie z przewidywaniami. Ponadto, wartości ładunków wyznaczonych metodą Mullikena okazały się silnie zależne od metody i bazy funkcyjnej użytej w obliczeniach* [33]. Natomiast wielkości ładunków wyznaczonych metodą NBO są praktycznie niezależne od użytej bazy i metody. Co istotne analiza NBO pokazała, iż atomy węgla w pozycji *orto*- (C2 i C6) oraz w pozycji *para*- (C4) posiadają największy ujemny ładunek spośród wszystkich atomów w pierścieniu aromatycznym. Odzwierciedla to dobrze znany fakt, iż grupa aminowa w procesie substytucji elektrofilowej kieruje podstawienie w pozycje *orto* i *para*. Natomiast ładunki wyznaczone metodą Mullikena wskazują na substytucję elektrofilową w pozycji *meta* (węgle C3 i C5) co jest sprzeczne z doświadczeniem. Ponadto, atomy C2 i C6 posiadają zgodnie z analizą populacyjną Mullikena ładunek dodatni, co wykluczałoby możliwość substytucji elektrofilowej aniliny w pozycji *orto* (rysunek 3).

* Przykładowo ładunek wyznaczony metodą Mullikena dla atomu C1 w anilinie, wynosił od $-0,57e$ (MP2) do $-0,91e$ (B3LYP) dla obliczeń wykonanych w bazie 6-311++G(*df*,*pd*) i wzrastał o około $+0,1e$, przy pominięciu funkcji dyfuzyjnych [33].

Jak wspomniano, wartości wyznaczonych ładunków Mullikena okazały się niewiarygodnie, natomiast metoda NBO pozwoliła dodatkowo między innymi na opisanie rozkładu ładunku i przeniesienia ładunku w cząsteczkach, wskazanie typów wiązań (typów orbitali NBO) w cząsteczce, scharakteryzowanie naturalnych orbitali NBO wraz z ilościowym określeniem hybrydyzacji i gęstości elektronowych przypisanym poszczególnym orbitalom w cząsteczce oraz na ilościowe określenie oddziaływań donor→akceptor, w pracy skupiono się na wykorzystaniu analizy NBO.



Rys. 3. Porównanie ładunków wyznaczonych metodą Mullikena (lewa strona) oraz metodą NBO (prawa strona) dla cząsteczki aniliny.

Idea naturalnych orbitali została wprowadzona jeszcze w 1955 roku przez P. Löwdina do opisu zbioru jednoelektronowych funkcji ortonormalnych $\theta_i(\vec{r})$ wyrażających gęstość elektronową $\rho(\vec{r})$, określaną jako kwadrat modułu całkowitej wieloelektronowej funkcji falowej Ψ [48]. Następnie koncepcja naturalnych orbitali molekularnych została rozwinięta przez zespół badaczy kierowany przez Reeda oraz Weinholda i wykorzystana do stworzenia oprogramowania do obliczeń NBO [30], wchodzącego w skład wielu popularnych pakietów obliczających strukturę elektronową, w tym wykorzystywanego w pracy oprogramowania GAUSSIAN. Standardowo procedura obliczeń naturalnie zlokalizowanych orbitali przebiega jako sekwencja rozpoczynająca się

od orbitali atomowych (AO), poprzez naturalne orbitale atomowe (NAO), hybrydy naturalnych orbitali (HNO) do naturalnych wiązań atomowych (NBO). Naturalny orbital atomowy NBO jest zwykle jedno lub dwucentrowym orbitalem opisującym oddziaływanie wiążące typu Lewisa. W przypadku układów zamkniętopowłokowych (takich jak anilina i jej halogenopochodne) rozważanych jest $N/2$ orbitali NBO, natomiast dla układów otwartopowłokowych, (takich jak rodnik kationowy aniliny), rozważanych jest N spinorbitali, gdzie N jest liczbą elektronów [49]. Dalsza transformacja orbitali wiązań chemicznych NBO prowadzi do uzyskania (semi-) zlokalizowanych orbitali molekularnych (NLMO) oraz kanonicznych orbitali molekularnych (MO). Pomimo, iż każdy z wymienionych powyżej zbiorów naturalnie zlokalizowanych orbitali może odtworzyć każdą właściwość funkcji falowej Ψ , to każde kolejne przybliżenie rzeczywistej struktury elektronowej w cząsteczce zawiera w sobie więcej informacji. Przykładowo, opis orbitali NAO bazujący jedynie na rozróżnianiu elektronów rdzenia i walencyjnych, pozwala przewidzieć wiele właściwości cząsteczki i w zwarty sposób przedstawić funkcję falową Ψ w sposób bliski koncepcji orbitali tworzonych przez elektrony walencyjne (orbitali walencyjnych). Unitarna transformacja orbitali NAO prowadzi do uzyskania symetrycznie ortogonalnych orbitali hybrydowych NHO, wnosząc dodatkowo informację o hybrydyzacji poszczególnych atomów [50].

Należy zauważyć, że omawiane w pracy naturalne orbitale wiązań NBO nie są tożsame z orbitalami wiążącymi w teorii LCAO MO [51]. Dla wyraźnego zaakcentowania tej różnicy, w niniejszej pracy przyjęto orbitale uzyskane na drodze analizy NBO nazywać naturalnymi orbitalami wiążącymi NBO lub naturalnymi orbitalami wiązań NBO, w odróżnieniu od orbitali wiążących (ang. *bonding orbitals*) [51]. Także formalnie puste orbitale antywiązące NBO nie są utożsamiane z nieobsadzonymi orbitalami LUMO z teorii orbitali HOMO/LUMO.

W metodzie NBO naturalne orbitale wiązań tworzone są na bazie naturalnych hybrydów atomowych (NHO). Każde wiązanie σ_{AB} , może być zapisane przy pomocy dwóch zorientowanych hybrydów walencyjnych, h_A i h_B zlokalizowanych na atomach A i B:

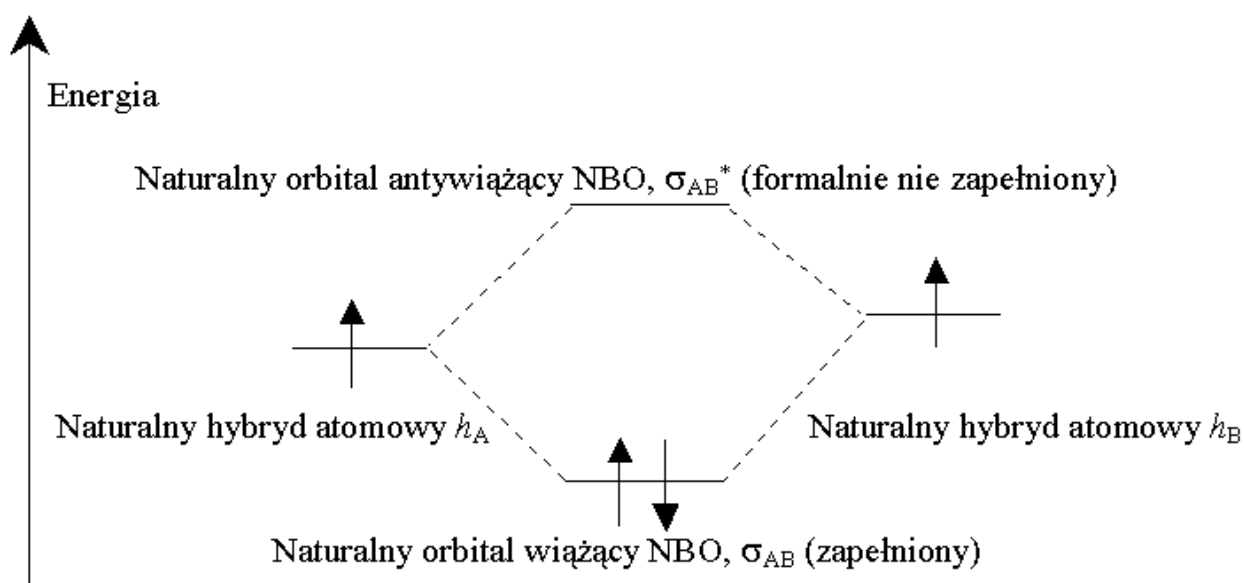
$$\sigma_{AB} = c_A \cdot h_A + c_B \cdot h_B \quad (4)$$

gdzie parametry c_A i c_B odpowiadają współczynnikom polaryzacji, a zależność między nimi zmienia się płynnie od $c_A = c_B$ dla wiązania kowalencyjnego, do $c_A \gg c_B$ dla wiązania

jonowego. Każdej kombinacji addytywnej elektronów walencyjnych tworzącej naturalny orbital wiązania NBO, zwanej orbitalem typu Lewisa (ang. *natural bond orbital or Lewis-type orbital*), musi odpowiadać odpowiednie oddziaływanie subtraktywne, nazywane naturalnym orbitalem antywiążącym NBO lub orbitalem nie-Lewisa NBO (ang. *antibond or non-Lewis NBO*), oznaczane w analizie NBO symbolem gwiazdki (*):

$$\sigma_{AB}^* = c_B \cdot h_A - c_A \cdot h_B \quad (5)$$

Z tego względu donory NBO typu Lewisa powiązane są z formalnie pustymi w wyidealizowanej strukturze Lewisa, akceptorami typu nie-Lewisa*. Nazwa naturalnych orbitali antywiążących NBO wynika z tego, iż mają one energię wyższą nie tylko od naturalnych orbitali wiązań NBO, ale także od naturalnych hybrydów atomowych HNO tworzących orbitale wiążące NBO co przedstawiono schematycznie na rysunku 4.



Rys. 4. Diagram poziomów energetycznych orbitali NHO i orbitali NBO.

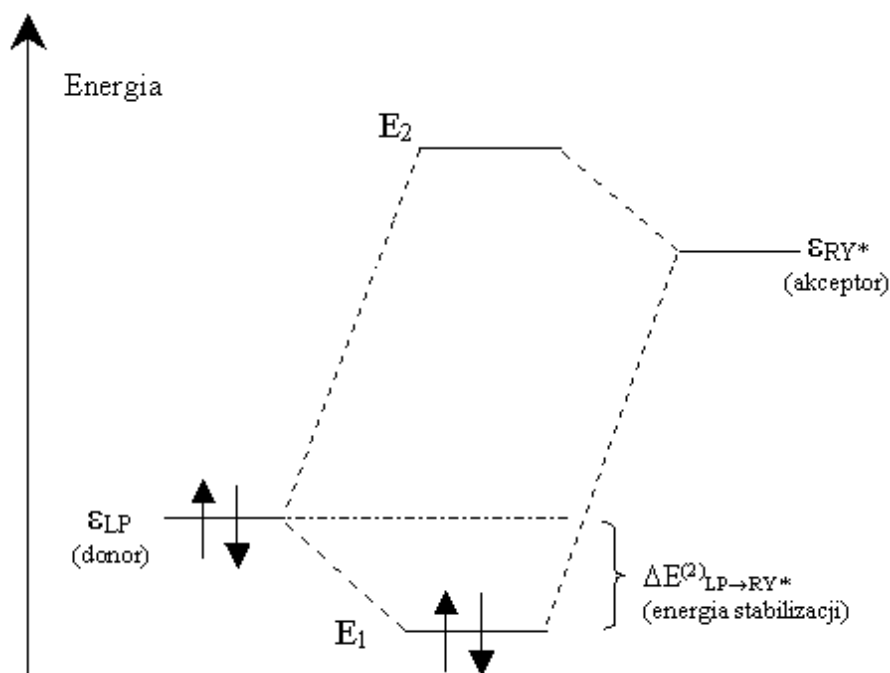
Niskie obsadzenie naturalnych orbitali antywiążących NBO wskazuje na pewne odstępstwa od wyidealizowanej struktury Lewisa i odzwierciedla efekt delokalizacji. Utworzeniu każdego wiązania w metodzie NBO towarzyszy pewna energia oddziaływania

* Przejście elektronów z orbitali izolowanych atomów Ψ_A i Ψ_B na naturalny orbital wiązań Ψ_{AB} w cząsteczce prowadzi do obniżenia energii, natomiast przejście na naturalny orbital anty-wiązań Ψ_{AB}^* związane jest ze wzrostem energii w porównaniu z układem izolowanych atomów.

$\sigma \rightarrow \sigma^*$ donor-akceptor, która może być określona na podstawie teorii zaburzeń drugiego rzędu. Jeśli donorem gęstości elektronowej jest orbital i , a akceptorem orbital j , energia stabilizacji wiązania $\sigma_i \rightarrow \sigma_j^*$ wynosi:

$$\Delta E_{i \rightarrow j^*}^{(2)} = -2 \frac{\langle \sigma_i | \hat{F}_{i,j} | \sigma_j \rangle^2}{\varepsilon_{j^*} - \varepsilon_i} \quad (6)$$

gdzie \hat{F} jest operatorem Focka lub Kohn-Shama, a ε_i oraz ε_{j^*} są odpowiednio energiami orbitali NBO dla donora i akceptora gęstości elektronowej. Zgodnie z rysunkiem 5, opisane oddziaływanie prowadzi do obniżenia energii zapełnionego orbitalu donora σ_i o wyznaczoną wartość $\Delta E_{i \rightarrow j^*}^{(2)}$ a w efekcie do stabilizacji wiązania donor-akceptor.



Rys. 5. Energia stabilizacji. Oddziaływanie donor-akceptor, pomiędzy zapełnionym orbitalem σ_i (donorem), a formalnie pustym orbitalem σ_φ^* (akceptorem).

W wyniku przedstawionej procedury, dla każdego oddziaływania $\sigma_i \rightarrow \sigma_j^*$, do początkowych naturalnych orbitali wiążących NBO dodawany jest niewielki udział naturalnych orbitali antywiązących NBO, co prowadzi do uzyskania naturalnie zlokalizowanego orbitalu cząsteczkowego NLMO Ω_i (ang. *natural localized molecular*

orbital). Formalnie, każdy semi-zlokalizowany NLMO Ω_i może być wyrażony poprzez liniową kombinację wyjściowej struktury NBO typu Lewisa σ_i (ze współczynnikiem $c_{ii} \cong 1$) i pozostałymi nieznacznymi udziałami ($c_{ij} \cong 0$) pochodzącymi od oddziaływań nie-Lewisowskich (NL) NBO σ_i^* :

$$\Omega_i = c_{ii} \cdot \sigma_i + \sum_j^{NL} c_{ji} \cdot \sigma_j.$$

Przedstawiony zapis odzwierciedla efekt delokalizacji $\sigma_i \rightarrow \sigma_j^*$, co jest bardzo bliskie koncepcji struktury elektronowej cząsteczki rozważanej przez chemików [53].

Program NBO w bezpośredni sposób korzysta z przedstawionych tu zależności wskazując wolne pary elektronowe i orbitale o największej gęstości elektronowej. Ściśle biorąc, obraz wiązań chemicznych oraz wolnych par elektronowych, z powodu dowolności wyboru transformacji, można uzyskać na nieskończenie wiele sposobów, a za każdym razem efekt lokalizacji jest nieznacznie inny [2, strona 406]. Program NBO w pierwszej kolejności rozróżnia orbitale o dużym obsadzeniu przez elektrony (orbitale rdzenia, wolne pary elektronowe, wiązania), a następnie formalnie puste (orbitale antywiązące NBO oraz Rydberga). W przypadku aniliny, 97,168% gęstości elektronowej odpowiada orbitalom typu Lewisa opisującym zlokalizowaną *naturalną strukturę Lewisa* (NLS). Pozostałe orbitale nie-Lewisa, które skupiają 2,832% całkowitej gęstości elektronowej, odzwierciedlają delokalizację gęstości elektronowej*. Z tego powodu metoda NBO opisuje funkcję falową cząsteczki, w sposób bardzo zbliżony do klasycznej koncepcji Lewisa, w której „kreski” symbolizujące wiązania chemiczne odpowiadają obsadzonym orbitalom naturalnych wiązań chemicznych NBO [52].

W tabeli 2 zestawiono wartości naturalnych ładunków NBO wyznaczone w programie GenNBO 5.0[†] dla cząsteczek omawianych w rozdziale. Dla cząsteczki aniliny największą ujemną wartość ładunku NBO, spośród atomów w pierścieniu, mają atomy węgla w pozycji *orto*- (C2 i C6) oraz *para*- (C4). Potwierdza to znany fakt, iż podstawnik $-\text{NH}_2$ jest grupą, która aktywuje pierścień kierując reagent elektrofilowy w położenia *orto* i *para*.

* Orbitale walencyjne typu nie-Lewisa w cząsteczce aniliny stanowią udział 2,657% całkowitej gęstości elektronowej, natomiast orbitale Rydberga typu nie-Lewisa zawierają 0,175% gęstości elektronowej.

[†] Podobne wartości ładunków uzyskano wykorzystując wersję NBO 3.1 zaimplementowaną w programie Gaussian. Jedyna istotna różnica dotyczyła ładunku atomu C1: 0,168e dla obliczeń w wersji 3.1 oraz 0,188e dla obliczeń w wersji 5.0 programu NBO.

Tabela 2. Zestawienie wartości naturalnych ładunków atomowych NBO, wyznaczonych w programie GenNBO 5.0 - metoda B3LYP, bazie funkcyjna 6-311++G(df,pd).

Atom	A	A ⁺	2FA	3FA	4FA	4CIA	4BrA	PFA
C1	0,188	0,258	0,111	0,185	0,153	0,167	0,169	0,066
C2	-0,264	-0,169	0,368	-0,323	-0,234	-0,237	-0,238	0,319
C3	-0,181	-0,172	-0,250	0,437	-0,246	-0,204	-0,205	0,315
C4	-0,248	-0,038	-0,229	-0,313	0,378	-0,074	-0,142	0,286
C5	-0,181	-0,172	-0,196	-0,163	-0,246	-0,204	-0,205	0,315
C6	-0,264	-0,169	-0,241	-0,272	-0,234	-0,237	-0,238	0,319
N7	-0,799	-0,572	-0,791	-0,788	-0,795	-0,795	-0,794	-0,787
X8	0,198	0,234	-0,367	0,215	0,201	0,203	0,203	-0,337
X9	0,202	0,245	0,220	-0,357	0,219	0,219	0,219	-0,316
X10	0,204	0,235	0,206	0,221	-0,360	-0,009	0,055	-0,318
X11	0,202	0,245	0,205	0,205	0,219	0,219	0,219	-0,316
X12	0,198	0,234	0,202	0,201	0,201	0,203	0,203	-0,337
H13	0,373	0,421	0,388	0,376	0,372	0,375	0,376	0,396
X14	0,373	0,421	0,376	0,376	0,372	0,375	0,376	0,396

^a X = H, F, Cl lub Br w zależności od cząsteczki.

Dla rodnika aniliny A⁺ uwagę zwraca wartość najwyższego dodatniego ładunku przewidziana dla atomu C1. Należy podkreślić, iż w przypadku rodnika aniliny, algorytm NBO rozgranicza macierze gęstości dla układów α i β spin, zgodnie z metodą „*różne hybrydy dla różnych spinów*”^{*} opisaną przez Carpentera i Reinholda dla układów otwarto powłokowych [49]. Z tego powodu możemy mówić o różnej delokalizacji α i β gęstości elektronowej. W przypadku rodnika kationowego aniliny, można przyjąć, iż układ elektronów o spinie α jest bardziej zdelokalizowany, gdyż gęstość elektronowa na orbitalu walencyjnym p_{C4} (prostopadłym do płaszczyzny cząsteczki) pochodzi jedynie od elektronów α . Jednocześnie obsadzenie orbitalu antywiążącego NBO σ_{CN}^* maleje o $0,0024e$ w stosunku do aniliny. Tłumaczy to dlaczego wiązanie C1-N7 staje się mocniejsze podczas jonizacji aniliny. Dodatkowo gęstość elektronowa przypisana wolnej parze elektronowej atomu azotu LP_N , maleje o $0,9373e$, co skutkuje planarną konformacją

^{*} Ang. *Defferent hybrids for different spins* (DHDS NBO) [49].

grupy aminowej w rodniku kationowym*. Z drugiej strony, analiza NBO wskazuje na wzrost gęstości elektronowej na orbitalu antywiązącym NBO σ_{NH}^* o około $0,0011e$ w stosunku do aniliny, co związane jest z osłabieniem wiązania N-H [33]. Wszystkie wzmiankowane oddziaływania znajdują potwierdzenie w widmie eksperymentalnym uzyskanym dla rodnika kationowego [33, 54].

W pozostałych cząsteczkach rozkład gęstości elektronowej jest kompozycją opisanego oddziaływania grupy aminowej oraz atomu halogenu, który dezaktywując pierścień kieruje reagent elektrofilowy w położenie *orto* i *para*†. Wprowadzenie atomu lub atomów halogenów, generuje ujemny efekt indukcyjny, związany z wyciąganiem z układu aromatycznego σ gęstości elektronowej. Względny ujemny efekt indukcyjny wyznaczony eksperymentalnie w odniesieniu do atomu wodoru, dla omawianych w pracy podstawników, rośnie zgodnie z szeregiem: $\text{H} < \text{Br} < \text{Cl} < \text{F}$ [55]. Znajduje to pełne potwierdzenie w danych zawartych w tabeli 2. Dla *para*-halogeno anilin wartość naturalnego ładunku NBO wyznaczonego dla atomu C4 maleje w analogicznej kolejności $\text{A} > 4\text{BrA} > 4\text{ClA} > 4\text{FA}$. Kumulację efektu indukcyjnego wyraźnie widać w cząsteczce PFA, gdzie aż pięć podstawionych fluorami atomów węgla „zmienia” ładunek na dodatni w odniesieniu do aniliny. Konkurencja o gęstość σ elektronową w PFA, powoduje obniżenie gęstości elektronowej przypisanej atomowi azotu, w stosunku do aniliny i innych halogenopochodnych aniliny.

Interesujący jest ładunek dodatni przypisany atomowi bromu ($0,055e$). Sugeruje on, iż *de facto* atom bromu w cząsteczce 4BrA, nie jest akceptorem gęstości elektronowej, lecz jest jej donorem. Zgodnie z konwencją NBO, wiązanie $\sigma_{\text{C4-Br}}$ może być opisane jako: $\sigma_{\text{C4-Br}} = 0,7024 (sp^{3,54}) + 0,7118 (sp^{6,34})$. Współczynniki polaryzacji wiązania, reprezentowane w równaniu przez liczby 0,7024 oraz 0,7118, określają wpływ poszczególnych hybrydów na tworzące się wiązanie i świadczą o nieznacznym przesunięciu wiązania w kierunku atomu bromu (wyciąganiu gęstości σ elektronowej). Jednakże, atom bromu jest równocześnie donorem gęstości elektronowej poprzez wolne pary elektronowe atomu bromu LP(Br), a akceptorami są orbitale antywiązące NBO. W cząsteczce 4BrA można wyróżnić aż osiem oddziaływań pomiędzy zajęтым orbitalami

* Można przyjąć, iż bardzo niska gęstość elektronowa na atomie azotu w rodniku kationowym aniliny ($-0,572e$) związana jest ze znikomym obsadzeniem orbitalu LP_N (tylko $0,91346e$ w stosunku do $1,85076e$ dla aniliny).

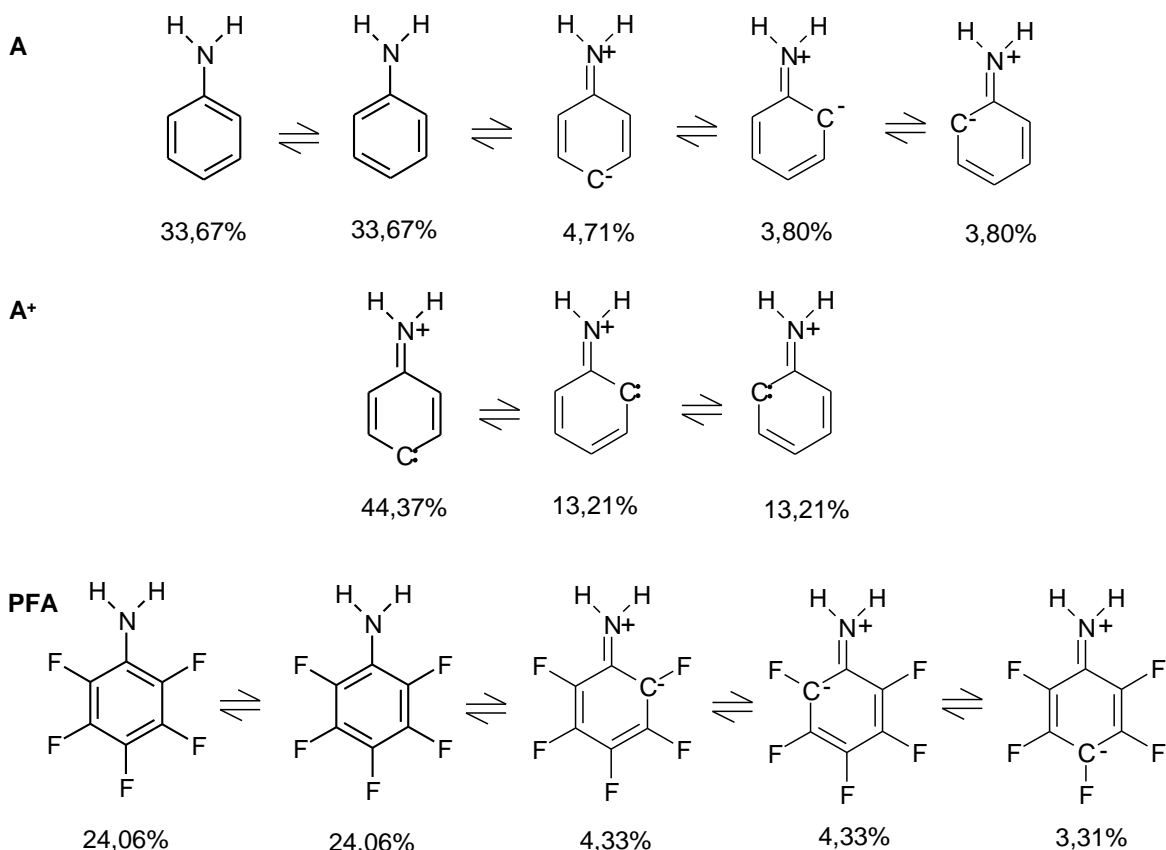
† W przypadku podstawienie pierścienia benzenowego atomem fluoru, atom węgla połączony z atomem fluoru zyskuje dodatni naturalny ładunek NBO, natomiast naturalny ładunek NBO jest najniższy na atomach węgla *orto* i *para* w stosunku do miejsca postawienia atomu fluoru.

NBO typu Lewisa (donorami), a formalnie pustymi orbitalami NBO typu nie-Lewisa (akceptorami). $LP1(Br) \rightarrow Ry^*_{C4}$; $LP1(Br) \rightarrow \sigma^*_{C3-C4}$; $LP1(Br) \rightarrow \sigma^*_{C4-C5}$; $LP2(Br) \rightarrow Ry^*_{C4}$; $LP1(Br) \rightarrow \sigma^*_{C3-C4}$; $LP2(Br) \rightarrow \sigma^*_{C4-C5}$; $LP3(Br) \rightarrow Ry^*_{C4}$ oraz $LP3(Br) \rightarrow \pi^*_{C4-C5}$. Energia stabilizacji wynikająca z oddziaływania trzeciej wolnej pary elektronowej atomu bromu $LP3(Br)$ z orbitalem antywiążącym NBO π^*_{C4-C5} jest najwyższa spośród wymienionych oddziaływań i wynosi aż 9,11 kcal/mol, co zapewnia stabilizację cząsteczki. Równocześnie oddziaływanie to powoduje iż naturalny ładunek NBO atomu bromu w cząsteczce 4BrA jest dodatni (0,055e).

Spośród opisywanych cząsteczek najwyższą wartość naturalnego ładunku NBO dla atomów węgla tworzących układ aromatyczny, została przewidziana dla atomu C3 w cząsteczce 3FA. Przyłączenie atomu fluoru powoduje „inwersję” znaku określającego ładunek NBO na atomie węgla w stosunku do aniliny. Dodatkowo atom C3 w 3FA znajduje się w pozycji meta w stosunku do grupy aminowej, a więc w pozycji w której grupa aminowa nie wpływa znacząco na obniżenie gęstości elektronowej. Natomiast najniższą wartość naturalnego ładunku NBO została przewidziana dla atomu azotu w anilinie, w której to cząsteczce atom azotu nie musi konkurować z fluorowcami o gęstość σ elektronową wyciąganą z pierścienia. Warto zwrócić też uwagę na bardzo niską gęstość elektronową na atomie azotu (-0,572e) w kationie rodnikowym aniliny, związaną ze „spłaszczeniem” grupy aminowej.

Na podstawie naturalnej teorii rezonansowej (*natura rezonanse theory*) [56] można określić udział poszczególnych struktur kanonicznych. Na rysunku 6 przedstawiono wiodące struktury rezonansowe dla A, A^+ oraz PFA. Dla cząsteczki aniliny przeważają dwie formy odpowiadające strukturze Kekulégo (razem 67,34%). Trzecia struktura rezonansowa aniliny odpowiada strukturze chinonu, która jest wiodącą strukturą dla rodnika kationowego aniliny. Jak wspomniano, w przypadku rodnika kationowego aniliny, analiza NBO wskazuje na istnienie dwóch orbitali π_{CC} (π_{C2C3} i π_{C5C6}) oraz jednego orbitalu π_{C1N} odpowiedzialnego za spłaszczenie rodnika. Zgodnie z tabelą 2, naturalny ładunek NBO na atomie azotu w A^+ jest ponad 0,2e wyższy niż w pozostałych omawianych związkach, co potwierdza poprawność struktury przedstawionej na rysunku 6. Natomiast naturalny ładunek NBO przypisany atomowi węgla C4 (-0,38e), związany jest z wolną parą elektronową $LP1(C4)$ o obsadzeniu „tylko” 0,58317e, wykreowaną w kationie rodnikowym aniliny.

Spośród wszystkich halogenoanilin, w cząsteczce PFA, obserwowany jest najmniejszy udział dwóch struktur referencyjnych (tylko 48,12%). Pozostały udział stanowią struktury wynikające z delokalizacji wiązań chemicznych wpływające na stabilizację struktury cząsteczki. Należy zaznaczyć, że ze względu na przyjęty formalizm zapisu, ładunek dodatni zaznaczono przy atomie azotu, jednak szczegółowa analiza pokazuje iż jest on rozmyty także na część atomów układu aromatycznego.



Rys. 6. Udział procentowy wiodących struktur rezonansowych dla cząsteczek aniliny, rodnika kationowego aniliny oraz 2,3,4,5,6-pentafluoroaniliny.

W górnej części tabeli 3 przedstawiono obsadzenie orbitalu wiążącego $\sigma(\text{C1-N})$ NBO oraz orbitali wolnych par elektronowych dla atomu azotu LP (N) i atomów halogenów LP (X). Natomiast w dolnej części tabeli przedstawiono wartości energii stabilizacji, wyznaczonej na podstawie rachunku zaburzeń drugiego rzędu.

Zgodnie z oczekiwaniami najniższa gęstość elektronowa dla wiązania $\sigma(\text{C1-N})$, obserwowana jest dla rodnika kationowego aniliny oraz PFA i 3FA, w których to cząsteczkach długości wiązania C1-N były najkrótsze. Dla rodnika kationowego aniliny, orbital wolnej pary elektronowej LP (N) tworzony jest jedynie przez elektrony α , dlatego

obsadzenie orbitalu LP (N) dla A^+ jest o około połowę niższe, niż w przypadku pozostałych związków. Także energia stabilizacji $LP(N7) \rightarrow \pi^*CC$ w przypadku A^+ jest jedynie wynikiem oddziaływania elektronów alfa (orbitalu LP(N7) o czystej hybrydyzacji typu p , będącego donorem α gęstości elektronowej i akceptorem α gęstości elektronowej, w postaci orbitali antywiążących π^*CC NBO).

Dla pozostałych związków obserwujemy spadek gęstości elektronowej na orbitalu wolnej pary elektronowej atomu azotu zgodnie z kolejnością: $4FA > A > 4ClA > 4BrA > 2FA > 3FA > PFA$. Związane jest to ze zmianą energii oddziaływania pomiędzy wolną parą elektronową na atomie azotu LP(N7), będącej donorem gęstości elektronowej, a chmurą π -elektronową będącą akceptorem gęstości elektronowej [8]. W przypadku 4FA wartość energii stabilizacji jest najniższa, co tłumaczy wysoką gęstość elektronową na orbitalu wolnej pary elektronowej LP (N). Dla kolejnych związków w wymienionym szeregu energia stabilizacji $LP(N7) \rightarrow \pi^*CC$ systematycznie rośnie redukując wielkość gęstości elektronowej na orbitalu LP(N) w tych cząsteczkach.

Podobną zależność obserwujemy w przypadku oddziaływania trzeciej wolnej pary elektronowej atomu halogenu z chmurą nad pierścieniem aromatycznym. Najniższa wartość energii stabilizacji $LP3(X) \rightarrow \pi^*CC$ została wyznaczona dla 4BrA, gdzie obserwowane jest największe obsadzenie orbitalu trzeciej wolnej pary elektronowej LP3(Br). Dla *para*-halogenoanilin pokazano [8], iż chlor i brom indukują wzmocnienie przekazywania gęstości elektronowej z orbitalu LP(N) do układu aromatycznego, natomiast silne oddziaływanie $LP3(F) \rightarrow \pi^*CC$ powoduje osłabienie oddziaływania stabilizującego pomiędzy orbitalem wolnej pary elektronowej atomu azotu z π -gęstością elektronową. Dlatego porównując *para*-halogenoaniliny, 4BrA posiada najbardziej spłaszczoną grupę aminową, a 4FA grupę aminową o największej piramidalizacji [8].

Zestawiając wartości energii oddziaływania $LP3(F) \rightarrow \pi^*CC$ dla fluoro pochodnych aniliny, zarówno analizując dane dla *mono*-fluoroanilin, jak i dla PFA, obserwujemy najwyższą wartość energii stabilizacji dla fluoru podstawionego w pozycji meta, co odpowiada najmniejszej gęstością elektronowej na orbitalu wolnej pary elektronowej LP3(F9). Najwyższa wartość energii stabilizacji dla 3FA, rzutuje także na to, iż 3FA jest najbardziej stabilnym izomerem strukturalnym spośród *mono*-fluoroanilin*.

* Dla *mono*-fluoroanilin energia ZPVE (kJ/mol) odniesiona do najbardziej stabilnego izomeru 3FA wynosi: 3,80 (2FA); 0,00 (3FA) oraz 9,95 (4FA) [34].

Tabela 3. Obsadzenie (e) wybranych orbitali NBO oraz energie stabilizacji donor \rightarrow akceptor NBO (E^2 , kcal/mol) wyznaczone w programie GenNBO 5.0 - metoda B3LYP, baza funkcyjna 6-311++G(df,pd).

Gęstość elektronowa	A	A⁺	2FA	3FA	4FA	4ClA	4BrA	PFA
$\sigma(\text{C1-N})$	1.9918	1,9908	1.9903	1.9918	1.9916	1.9917	1.9917	1.9884
LP (N)	1.8508	0,9135	1.8427	1.8411	1.8580	1.8478	1.8456	1.8294
LP3 (X)	-	-	1.9363	1.9272	1.9346	1.9391	1.9470	1.9335 _o 1.9253 _m 1.9296 _p
Donor \rightarrow akceptor	A	A⁺	2FA	3FA	4FA	4ClA	4BrA	PFA
LP(N7) $\rightarrow\pi^*\text{CC}$	27.14	38.31 _{α}	28,55	28,99	26.15	27.70	28.08	32,57
LP3(X) $\rightarrow\pi^*\text{CC}$	-	-	16,28	19,07	17.09	11.53	9.11	17,80 _o 19,76 _m 18,51 _p

X = F, Cl, Br w zależności od cząsteczki. Oznaczenie indeksów dolnych w tabeli: α - elektrony α ; β - elektrony β ; o - pozycja orto, m - pozycja meta, p - pozycja para

1.5.3 Widma oscylacyjne

W tabelach 4-11 oraz na rysunkach 7-15 zestawiono widma oscylacyjne A, A⁺, 2FA, 3FA, 4FA, 4ClA, 4BrA i PFA [7, 33, 34, 35]. Wyznaczone teoretycznie liczby falowe w przybliżeniu harmonicznym, dla częstości odpowiadającym drganiom rozciągającym $\nu(\text{C-H})$ oraz $\nu(\text{N-H})$ zostały przeskalowane z użyciem współczynnika skalującego równego 0,958, natomiast dla pozostałych drgań o częstości poniżej 2000 cm^{-1} , użyto współczynnika skalującego 0,983. W celu dokładniejszego opisu teoretycznych i eksperymentalnych drgań oscylacyjnych w tabelach przedstawiono także rozkład energii potencjalnej drgań normalnych (*potential energy distribution*, PED). Pełen opis symboli użytych do opisu drgań charakterystycznych [2, str. 302] wraz z definicją współrzędnych wewnętrznych używanych w analizie drgań normalnych zawarto w tabeli 12.

Tabela 4. Anilina (A). Zestawienie eksperymentalnych (cm^{-1}) i teoretycznych liczb falowych (ω , cm^{-1}), intensywności pasm teoretycznego widma IR (A^{IR} , km/mol), aktywności ramanowskich (S^{R} , $\text{\AA}^4/\text{amu}$) wraz z rozkładem energii potencjalnej (PED). Obliczenia wykonano metodą B3LYP w bazie 6-311++G(df,pd) [33].

	Sym. ^a	Exp ^b	ω^c	A^{IR}	S^{R}	PED (%) ^d {faza}
1	A''	3508	3526	17.1	56.0	$\nu_{\text{as}}\text{NH}_2$ (100)
2	A'	3422	3430	20.3	194.9	$\nu_{\text{s}}\text{NH}_2$ (100)
3	A' (2)	3072	3060	11.7	247.9	$\nu(\text{C}_4\text{-H})$ (+67), $\nu(\text{C}_3\text{-H})$ (+15), $\nu(\text{C}_5\text{-H})$ (+15)
4	A'' (20b)	3050	3044	33.0	23.4	$\nu(\text{C}_3\text{-H})$ (+41), $\nu(\text{C}_5\text{-H})$ (-41)
5	A' (7a)	3037	3038	4.1	166.8	$\nu(\text{C}_4\text{-H})$ (+29), $\nu(\text{C}_5\text{-H})$ (-20), $\nu(\text{C}_3\text{-H})$ (-20), $\nu(\text{C}_2\text{-H})$ (-15), $\nu(\text{C}_6\text{-H})$ (-15)
6	A'' (7b)		3022	3.6	108.8	$\nu(\text{C}_2\text{-H})$ (+41), $\nu(\text{C}_6\text{-H})$ (-41)
7	A' (13)	3025	3021	17.1	16.7	$\nu(\text{C}_2\text{-H})$ (+33), $\nu(\text{C}_6\text{-H})$ (+33), $\nu(\text{C}_3\text{-H})$ (-15), $\nu(\text{C}_5\text{-H})$ (-15)
8	A'	1618	1632	160.9	30.3	sciss NH_2 (72), $\nu(\text{C-C})$ (16)
9	A' (8a)	1608	1617	24.1	16.7	sciss NH_2 (+26), $\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (-17), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (-17)
10	A'' (19b)	1470	1477	1.4	1.2	$\nu(\text{C}_3\text{-C}_4)$ (+18), $\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$ (-18), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$ (-17), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$ (+17), βCH (15)
11	A'' (8b)	1594	1599	1.4	3.7	$\beta\text{C}_3\text{H}$ (+16), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (-16), $\beta\text{C}_2\text{H}$ (+13), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (-13), $\nu(\text{C-C})$ (36)
12	A' (19a)	1503	1508	66.5	5.4	$\beta\text{C}_4\text{H}$ (+25), $\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (-15), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (+15), βCH (26)
13	A'' (3)	1340	1349	0.0	0.3	$\beta\text{C}_2\text{H}$ (+22), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (+22), $\beta\text{C}_3\text{H}$ (+16), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (+16), $\beta\text{C}_4\text{H}$ (+12)
14	A'' (14)	1324	1323	7.2	1.6	$\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$ (+14), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$ (-14), $\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (-12), $\nu(\text{C}_3\text{-C}_4)$ (+14), $\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$ (-14), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (+12), βCH (11), $\rho_{\text{r}}\text{NH}_2$ (8) {Kekulé mode}
15	A' (20a)	1282	1280	72.6	13.3	$\nu(\text{C}_1\text{-N})$ (+51), $\beta_{\text{1}}\text{ring}$ (+11), βCH (18), $\nu(\text{C-C})$ (16)
16	A' (9a)	1176	1183	11.3	2.8	$\beta\text{C}_2\text{H}$ (+20), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (-20), $\beta\text{C}_3\text{H}$ (-19), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (+19), $\nu(\text{C-C})$ (22)
17	A'' (9b)	1152	1163	2.1	4.1	$\beta\text{C}_4\text{H}$ (+35), $\beta\text{C}_3\text{H}$ (-20), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (-20), $\nu(\text{C-C})$ (18)
18	A'' (18b)	1115	1115	5.0	2.3	rock NH_2 (+27), $\beta\text{C}_2\text{H}$ (+14), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (+14), $\beta\text{C}_4\text{H}$ (-11), $\nu(\text{C-C})$ (30)
19	A''	1054	1043	2.6	0.1	rock NH_2 (43), $\nu(\text{C-C})$ (46), βCH (11)
20	A' (18a)	1028	1031	3.5	18.2	$\nu(\text{C}_3\text{-C}_4)$ (+29), $\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$ (+29), βCH (24)
21	A' (12)	996	996	2.7	34.9	$\beta_{\text{1}}\text{ring}$ (65), $\nu(\text{C-C})$ (34)

(trigonal ring breaching)

22	A' (5)	968	966	0.1	0.2	γ_{C_4H} (+30), γ_{C_3H} (-29), γ_{C_5H} (-29)
23	A'' (17a)	957	951	0.0	0.0	γ_{C_3H} (+35), γ_{C_5H} (-35), γ_{C_2H} (-15), γ_{C_6H} (+15)
24	A' (17b)	875	873	6.9	0.1	γ_{C_2H} (+31), γ_{C_6H} (+31), γ_{C_4H} (-27), $\gamma_{(C_1N)}$ (-11)
25	A' (1)	822	819	4.9	21.8	$\nu_{(C_1-N)}$ (+23), $\nu_{(C_1-C_2)}$ (+19), $\nu_{(C_1-C_6)}$ (+19), β_1 ring (16), β_2 ring (13)
26	A'' (10a)	812	816	0.0	0.2	γ_{C_2H} (+36), γ_{C_6H} (-36), γ_{C_3H} (+14), γ_{C_5H} (-14)
27	A' (11)	755	752	69.2	1.4	γ_{C_4H} (+36), $\gamma_{(C_1N)}$ (-24), τ_1 ring (13), γ_{C_3H} (+10), γ_{C_5H} (+10)
28	A' (4)	688	689	27.6	0.2	τ_1 ring (87), γ_{C-H} (10) (<i>ring puckering mode</i>)
29	A'' (6b)	619	626	0.3	4.5	β_3 ring (85), $\nu_{(C-C)}$ (10)
30	A'	(541)	541	107.0	7.9	inv NH ₂ (47), β_2 ring (34)
31	A' (6a)	526	525	48.7	1.5	β_2 ring (43), inv NH ₂ (15), $\nu_{(C_1-N)}$ (14), $\gamma_{(C_1N)}$ (10)
32	A' (16b)	501	489	166.0	1.0	inv NH ₂ (35), $\gamma_{(C_1N)}$ (27), τ_3 ring (21)
33	A'' (16a)	415	410	0.2	0.0	τ_2 ring (75), τ_3 ring (25)
34	A''	390	377	0.3	0.6	β_{C_1N} (82), $\nu_{(C-C)}$ (10)
35	A''	277	289	16.8	0.3	τ_{NH_2} (100)
36	A'	217	217	5.6	0.8	τ_3 ring (54), $\gamma_{(C_1N)}$ (17), τ_2 ring (17), τ_1 ring (11)

^a A' – drganie symetryczne*, A'' – drganie asymetryczne (oznaczenie notacji Wilsona dla drgań pierścienia benzenowego [57]);

^b Częstotliwości eksperymentalne [58] oraz zgodne z oznaczeniami w [33];

^c Liczby falowe od 1 do 6 zostały przeskalowane z użyciem współczynnika skalującego równego 0,958, pozostałe drgania przy użyciu współczynnika 0,983;

^d W tabeli zaznaczono udziały dominujących PED stosując oznaczenia ν - rozciąganie (*stretching mode*); δ - zginanie w płaszczyźnie cząsteczki (*in-plane deformation*); γ - zginanie poza płaszczyznę cząsteczki (*out-of-plane deformation*); τ - drganie deformacyjne (*deformation mode*); sciss – drganie nożycowe; rock – drganie wahadłowe; inv – drganie wachlarzowe (inwersja); tors – drganie torsyjne. Faza drania została oznaczona znakiem: plus odpowiada zginaniu w płaszczyźnie (lub poza płaszczyznę) zgodnie z ruchem wskazówek zegara, minus w przeciwnym kierunku.

* Symetria drgania odniesiona do płaszczyzny prostopadłej do powierzchni układu aromatycznego przechodzącej przez atomy C1, C4 i N7 (grupa symetrii C_s).

Tabela 5. Kation rodnikowy aniliny (A^+). Zestawienie eksperymentalnych (cm^{-1}) i teoretycznych liczb falowych (ω , cm^{-1}), intensywności pasm teoretycznego widma IR (A^{IR} , km/mol), aktywności ramanowskich (S^{R} , $\text{\AA}^4/\text{amu}$) wraz z rozkładem energii potencjalnej (PED). Obliczenia wykonano metodą UB3LYP w bazie 6-311++G(df,pd) [33].

	Sym.	Exp ^c	ω^b	A^{IR}	S^{R}	PED (%) ^d {faza}
1	B ₂	3488	3498	95.0	48.5	$\nu_{\text{as}}\text{NH}_2$ (100)
2	A ₁	3395	3391	257.7	120.0	$\nu_{\text{s}}\text{NH}_2$ (100)
3	A ₁		3080	2.4	260.0	$\nu(\text{C}_3\text{-H})$ (+32), $\nu(\text{C}_5\text{-H})$ (+32), $\nu(\text{C}_4\text{-H})$ (+31)
4	B ₂		3076	3.8	40.2	$\nu(\text{C}_3\text{-H})$ (+46), $\nu(\text{C}_5\text{-H})$ (-46)
5	A ₁		3066	0.0	71.9	$\nu(\text{C}_4\text{-H})$ (+64), $\nu(\text{C}_3\text{-H})$ (-10), $\nu(\text{C}_5\text{-H})$ (-10)
6	B ₂		3057	1.4	62.2	$\nu(\text{C}_2\text{-H})$ (+46), $\nu(\text{C}_6\text{-H})$ (-46)
7	A ₁		3056	0.0	42.3	$\nu(\text{C}_2\text{-H})$ (+40), $\nu(\text{C}_6\text{-H})$ (+40)
8	A ₁	1635	1646	114.9	12.0	sciss NH_2 (86), $\nu(\text{C}_1\text{-N})$ (12)
9	A ₁	1594	1604	28.0	68.6	$\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (+25), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (+25), βCH (24)
10	B ₂	1515	1524	12.9	1.6	$\beta\text{C}_4\text{H}$ (+28), $\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (-15), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (+15)
11	A ₁	1483	1491	76.7	129.8	$\nu(\text{C}_1\text{-N})$ (+23), $\beta\text{C}_3\text{H}$ (+13), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (-13)
12	B ₂	1434	1449	5.4	9.0	$\beta\text{C}_3\text{H}$ (16), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (16), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$ (-13), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$ (13)
13	B ₂		1351	1.4	1.1	$\beta\text{C}_4\text{H}$ (+23), $\beta\text{C}_2\text{H}$ (+21), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (+21)
14	B ₂	1360	1361	10.6	1.5	$\nu(\text{C-C})$ (76) ^{tot} (<i>Kekulé mode</i>)
15	A ₁	1385	1375	1.4	35.9	$\nu(\text{C}_1\text{-N})$ (+42), $\beta\text{C}_3\text{H}$ (-10), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (+10)
16	A ₁	1188	1193	0.1	21.6	$\beta\text{C}_2\text{H}$ (+21), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (-21), $\beta\text{C}_3\text{H}$ (-16), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (+16)
17	B ₂		1171	0.2	0.0	$\beta\text{C}_3\text{H}$ (+21), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (+21), $\beta\text{C}_4\text{H}$ (-19), $\nu(\text{C-C})$ (20)
18	B ₂	1107	1113	12.3	2.0	$\beta\text{C}_4\text{H}$ (+21), $\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$ (-16), $\nu(\text{C}_3\text{-C}_4)$ (+16)
19	B ₂		1010	0.0	0.1	rock NH_2 (59), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$ (+13), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$ (-13)
20	A ₁	993	992	8.6	26.5	$\nu(\text{C}_3\text{-C}_4)$ (+31), $\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$ (+31), βCH (16)
21	A ₁	982	979	0.4	12.4	β_{1ring} (63), $\nu(\text{C-C})$ (31) (<i>trigonal ring breatching</i>)
22	B ₁		1004	1.0	0.0	$\gamma\text{C}_3\text{H}$ (+32), $\gamma\text{C}_5\text{H}$ (+32), $\gamma\text{C}_4\text{H}$ (-26)
23	A ₂		995	0.0	0.1	$\gamma\text{C}_3\text{H}$ (+35), $\gamma\text{C}_5\text{H}$ (-35), $\gamma\text{C}_2\text{H}$ (-15), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (+15)
24	B ₁	913	928	5.2	0.4	$\gamma\text{C}_4\text{H}$ (+37), $\gamma\text{C}_2\text{H}$ (-28), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (-28)
25	A ₁	814	811	0.3	23.0	$\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$ (+28), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$ (+28), $\nu(\text{C}_1\text{-N})$ (+18)
26	A ₂		804	0.0	0.2	$\gamma\text{C}_2\text{H}$ (+33), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (-33), $\gamma\text{C}_3\text{H}$ (+14), $\gamma\text{C}_5\text{H}$ (-14)

27	B ₁	785	785	70.6	0.5	γ C ₁ N (+27), τ ₁ ring (23), γ C ₄ H (-21)
28	B ₁	622	626	119.6	0.2	τ ₁ ring (50), γ C ₁ N (+13), γ NH ₂ (-12), γ C ₄ H (+10) (<i>ring puckering mode</i>)
29	B ₂	582	585	0.6	2.9	β ₃ ring (76)
30	B ₁	652	639	82.8	0.6	inv NH ₂ (85)
31	A ₁	519	524	1.0	17.3	β ₂ ring (82)
32	B ₁	442	444	10.5	0.1	τ ₁ ring (36), γ C ₁ N (33), τ ₃ ring (28)
33	A ₂		361	0.0	0.0	τ ₂ ring (72), τ ₃ ring (24)
34	B ₂	386	383	2.7	1.3	β C ₁ N (79), β ₃ ring (10)
35	A ₂		555	0.0	0.3	tors NH ₂ (90)
36	B ₁	179	181	7.3	0.2	τ ₃ ring (53), γ C ₁ N (19), τ ₂ ring (17)

^a Oznaczenie symetrii drgania względem płaszczyzny A⁺ (grupa symetrii C_{2v});

^b Częstości eksperymentalne [59] oraz zgodne z oznaczeniami w [33];

^c Liczby falowe od 1 do 6 zostały przeskalowane z użyciem współczynnika skalującego równego 0,958, pozostałe drgania przy użyciu współczynnika 0,983;

^d W tabeli zaznaczono udziały dominujących PED stosując oznaczenia ν - rozciąganie (*stretching mode*); δ - zginanie w płaszczyźnie cząsteczki (*in-plane deformation*); γ - zginanie poza płaszczyznę cząsteczki (*out-of-plane deformation*); τ - drganie deformacyjne (*deformation mode*); sciss – drganie nożycowe; rock – drganie wahadłowe; inv – drganie wachlarzowe (inwersja); tors – drganie torsyjne; tot – sumaryczny udział danych drgań. Faza drania została oznaczona znakiem: plus odpowiada zginaniu w płaszczyźnie (lub poza płaszczyznę) zgodnie z ruchem wskazówek zegara, minus w przeciwnym kierunku.

Tabela 6. 2-fluoroanilina (2FA). Zestawienie eksperymentalnych (widma IR oraz Ramana) oraz teoretycznych liczb falowych w przybliżeniu anharmonicznym (ω_{anh} , cm^{-1}) i harmonicznym (ω_{h} , cm^{-1}), intensywności pasm teoretycznego widma IR (A^{IR} , km/mol), aktywności ramanowskich (S^{R} , $\text{\AA}^4/\text{amu}$) i teoretycznych intensywności ramanowskich ($I_{\text{anh}}^{\text{R}}$) wraz z rozkładem energii potencjalnej (PED). Obliczenia wykonano metodą B3LYP w bazie 6-311++G(df,pd) [34].

Exp. IR ^a	Exp. R	$\omega_{\text{anh}}^{\text{b}}$	$\omega_{\text{h}}^{\text{c}}$	A^{IR}	S^{R}	$I_{\text{anh}}^{\text{R}}$	PED (%) ^d {faza}
1 3520 m ^e		3530	3538	30	48.4	16	$\nu_{\text{as}}\text{NH}_2$ (100)
2 3429 m ^e	3380 br	3439	3437	36	183.1	66	$\nu_{\text{s}}\text{NH}_2$ (100)
	3220 w						overtone $2\nu_7$ (2·1632)
3 3070 sh	3078 m	3068	3069	4	217.7	98	$\nu(\text{C}_3\text{-H})$ (+48), $\nu(\text{C}_4\text{-H})$ (+44)
4 3050 w	3060 sh	3052	3057	10	65.6	30	$\nu(\text{C}_3\text{-H})$ (+47), $\nu(\text{C}_5\text{-H})$ (-26), $\nu(\text{C}_4\text{-H})$ (-24)
5	3050 sh	3054	3046	8	100.8	46	$\nu(\text{C}_5\text{-H})$ (+45), $\nu(\text{C}_4\text{-H})$ (-30), $\nu(\text{C}_6\text{-H})$ (+20)
6	3026 w	3017	3030	8	62.4	29	$\nu(\text{C}_6\text{-H})$ (+77), $\nu(\text{C}_5\text{-H})$ (-21)
7 1632 s	1631 m	1628	1638	124	47.0	61	sciss NH_2 (31), $\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (+16), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (+14)
8 ov		1604	1612	10	3.1	4	sciss NH_2 (63)
9 1586 m	1587 w	1585	1598	11	5.2	7	$\nu(\text{C}_3\text{-C}_4)$ (+21), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$ (+20), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$ (-11), $\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$ (-10)
10 1505 vs	1506 w	1508	1517	152	2.0	3	$\beta\text{C}_3\text{H}$ (-27), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (+24), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$ (+10), $\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$ (-10)
11 1464 m	1460 br	1472	1471	10	1.4	2	$\beta\text{C}_5\text{H}$ (+25), $\beta\text{C}_4\text{H}$ (+23), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (+12), $\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (-10)
12 1328 m	1329 w	1329	1338	10	4.5	8	$\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$ (+18), rock NH_2 (14), $\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$ (+13)
13 1304 m	1306 w	1310	1311	51	5.7	10	$\beta\text{C}_6\text{H}$ (+29), $\nu(\text{C}_1\text{-N})$ (+20), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (-14)
14 1270 m	1271 m	1275	1277	37	7.6	14	$\beta\text{C}_3\text{H}$ (+34), $\nu(\text{C}_1\text{-N})$ (-16), $\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (+15)
15 1206 s	1207 w	1194	1200	95	7.7	15	$\nu(\text{C}_2\text{-F})$ (+42), β_{ring} (20), $\nu(\text{C}_3\text{-C}_4)$ (-11)
16 1155 w	1156 w	1171	1164	4	3.1	6	$\beta\text{C}_5\text{H}$ (+39), $\beta\text{C}_4\text{H}$ (-18), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (-17), $\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$ (+10)
17 1134 w	1137 w	1135	1134	15	5.1	11	$\beta\text{C}_4\text{H}$ (+23), rock NH_2 (18), $\beta\text{C}_3\text{H}$ (-17), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (-11)
18 ov		1082	948	0	0.2	0.5	$\gamma\text{C}_5\text{H}$ (+66), $\gamma\text{C}_4\text{H}$ (-35), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (-16)
19 1067 w		1052	1054	5	3.7	9	rock NH_2 (26), $\nu(\text{C}_3\text{-C}_4)$ (+19), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$ (-13)
20 1026 w	1027 s	1024	1026	6	23.2	57	$\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$ (+30), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (+18), rock NH_2 (18)

21	923 w		953	920	5	0.0	0	$\gamma\text{C}_3\text{H}$ (+60), $\gamma\text{C}_4\text{H}$ (-22), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (+21)
22	860 w	865 w	855	851	12	2.0	6	$\beta_1\text{ring}$ (48), $\nu(\text{C}_1\text{-N})$ (+15), $\nu(\text{C}_2\text{-F})$ (-10)
23	850 sh		856	837	1	0.0	0	$\gamma\text{C}_6\text{H}$ (+54), $\gamma\text{C}_3\text{H}$ (-28), $\gamma\text{C}_4\text{H}$ (-10)
24	Ov	764 vs	766	762	19	28.4	100	$\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$ (+31), $\nu(\text{C}_2\text{-F})$ (+19), $\beta_3\text{ring}$ (18)
25	746 s		749	744	89	1.0	4	$\gamma\text{C}_4\text{H}$ (+41), $\gamma\text{C}_5\text{H}$ (+28), $\gamma\text{C}_3\text{H}$ (+13), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (+13)
26	Ov		792	701	1	0.5	2	$\tau_1\text{ring}$ (56), $\gamma\text{C}_1\text{N}$ (+32), $\gamma\text{C}_2\text{F}$ (-19)
27	573 m	575 m	586	579	1	8.6	41	$\beta_3\text{ring}$ (47), $\beta_2\text{ring}$ (25)
28	555 m		585	559	9	0.5	2	$\tau_1\text{ring}$ (45), $\tau_2\text{ring}$ (20), $\gamma\text{C}_1\text{N}$ (+20), $\gamma\text{C}_2\text{F}$ (-14)
29	537 m	539 m	519	536	28	5.2	29	$\beta_2\text{ring}$ (28), $\beta\text{C}_1\text{N}$ (+15), $\beta_3\text{ring}$ (14), $\beta\text{C}_2\text{F}$ (+14)
30	448 m	454 w	442	445	30	0.2	1	$\tau_3\text{ring}$ (48), $\tau_2\text{ring}$ (21), $\gamma\text{C}_2\text{F}$ (+18), $\gamma\text{C}_1\text{N}$ (+13)
31	437 sh	436 w	438	434	1	0.4	3	$\beta\text{C}_2\text{F}$ (+28), $\beta_2\text{ring}$ (24), $\beta\text{C}_1\text{N}$ (+17)
32	355 br		329	332	17	0.8	7	tors NH_2 (88)
33	299 m	297 m	300	291	5	0.5	5	$\beta\text{C}_1\text{N}$ (+50), $\beta\text{C}_2\text{F}$ (-34)
34	285 sh		285	278	9	1.2	13	$\gamma\text{C}_2\text{F}$ (+35), $\tau_3\text{ring}$ (35), $\gamma\text{C}_1\text{N}$ (+19)
35	200 w	200 m	187	182	3	1.4	23	$\tau_2\text{ring}$ (56), $\tau_3\text{ring}$ (26), $\tau_1\text{ring}$ (20)
36	(49.7) ^f		324	504	231	1.8	16	inv NH_2 (77)

^a objaśnienia skrótów: s- silne (strong); m- średnie (medium); w- słabe (weak); br- szerokie (broad); v- bardzo (very); ov – nadton (overtone)

^b Częstości drgań w przybliżeniu anharmonicznym (nieskalowane)

^c Liczby falowe od 1 do 6 w przybliżeniu harmonicznym zostały przeskalowane z użyciem współczynnika skalującego równego 0,958, pozostałe drgania przy użyciu współczynnika 0,983;

^d W tabeli zaznaczono udziały dominujących PED stosując oznaczenia ν - rozciąganie (*stretching mode*); δ - zginanie w płaszczyźnie cząsteczki (*in-plane deformation*); γ - zginanie poza płaszczyznę cząsteczki (*out-of-plane deformation*); τ - drganie deformacyjne (*deformation mode*); overtone – nadton; sciss – drganie nożycowe; rock – drganie wahadłowe; inv – drganie wachlarzowe (inwersja); tors – drganie torsyjne. Faza drania została oznaczona znakiem: plus odpowiada zginaniu w płaszczyźnie (lub poza płaszczyznę) zgodnie z ruchem wskazówek zegara, minus w przeciwnym kierunku.

^e Częstości dla fazy gazowej z [60]. Odpowiadające im częstości dla fazy ciekłej, wynoszą odpowiednio 3459 i 3376 cm^{-1} .

^f Zgodnie z [40] (2FA w fazie gazowej)

Tabela 7. 3-fluoroanilina (3FA). Zestawienie eksperymentalnych (widma IR oraz Ramana) oraz teoretycznych liczb falowych w przybliżeniu anharmonicznym (ω_{anh} , cm^{-1}) i harmonicznym (ω_{h} , cm^{-1}), intensywności pasm teoretycznego widma IR (A^{IR} , km/mol), aktywności ramanowskich (S^{R} , $\text{\AA}^4/\text{amu}$) i teoretycznych intensywności ramanowskich ($I_{\text{anh}}^{\text{R}}$) wraz z rozkładem energii potencjalnej (PED). Obliczenia wykonano metodą B3LYP w bazie 6-311++G(df,pd) [34].

Exp. IR ^a	Exp. R	$\omega_{\text{anh}}^{\text{b}}$	$\omega_{\text{h}}^{\text{c}}$	A^{IR}	S^{R}	$I_{\text{anh}}^{\text{R}}$	PED (%) ^d {faza}
1 3516 m ^e		3518	3536	21	54.1	20	$\nu_{\text{as}}\text{NH}_2$ (100)
2 3427 m ^e		3430	3437	29	188.8	73	$\nu_{\text{s}}\text{NH}_2$ (100)
3223 m							overtone $2\nu_7$ ($2 \cdot 1623$)
3 3086 sh	3090 sh	3070	3078	1	140.5	68	$\nu(\text{C}_4\text{-H})$ (94)
4 3062 m	3062 m	3048	3056	2	121.7	60	$\nu(\text{C}_2\text{-H})$ (98)
5 3045 vw	ov	3042	3050	14	89.8	44	$\nu(\text{C}_5\text{-H})$ (+68), $\nu(\text{C}_6\text{-H})$ (+25)
6 3032 w	3035 sh	3032	3033	9	64.7	32	$\nu(\text{C}_6\text{-H})$ (+74), $\nu(\text{C}_5\text{-H})$ (-25)
7 1623 vs	1625 sh	1619	1636	269	38.0	54	sciss NH_2 (46), $\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (+14), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (+13)
8 1614 vs	1614 m	1610	1624	18	5.9	8	sciss NH_2 (52), $\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (-14), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (-12)
9 1590 s	1590 w	1587	1602	85	2.6	4	$\nu(\text{C}_3\text{-C}_4)$ (+21), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$ (-18), $\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$ (-17), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$ (+13)
10 1495 vs	1497 vw	1494	1503	92	1.8	3	$\beta\text{C}_5\text{H}$ (+40), $\beta\text{C}_2\text{H}$ (-17), $\nu(\text{C}_3\text{-C}_4)$ (-11), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$ (+10)
11 1475 sh		1468	1476	15	0.6	1	$\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (+19), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (+19), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$ (+12), $\beta\text{C}_4\text{H}$ (-12)
12 1328 m	1329 w	1328	1331	16	3.9	7	$\nu(\text{C-C})$ (total 55), rock NH_2 (10)
13 1311 m	1314 w	1312	1317	19	6.1	12	$\nu(\text{C}_1\text{-N})$ (+25), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (+12), $\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (-11), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (+11)
14 1284 m	1285 m	1287	1290	39	11.0	22	$\beta\text{C}_2\text{H}$ (+20), $\beta\text{C}_4\text{H}$ (+17), $\nu(\text{C}_3\text{-F})$ (-11), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (+11)
15 1170 m	1171 w	1178	1177	24	1.1	3	$\beta\text{C}_5\text{H}$ (+33), $\nu(\text{C}_3\text{-F})$ (-14), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (-11), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (-10)
16 1146 vs	1147 w	1152	1151	102	3.8	9	$\nu(\text{C}_3\text{-F})$ (+25), $\beta\text{C}_2\text{H}$ (+23), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (-20)
17 1100 sh		1095	1101	2	4.3	10	rock NH_2 (30), $\beta\text{C}_4\text{H}$ (+20), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (-12), $\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$ (-10)
18 1061 m	1063 w	1049	1057	4	2.3	6	$\nu(\text{C-C})$ (41), rock NH_2 (33), $\beta\text{C}_4\text{H}$ (14)
19 ov		1029	952	1	0.3	1	$\gamma\text{C}_5\text{H}$ (+81), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (-20), $\gamma\text{C}_4\text{H}$ (-15)
20 1000 m	1001 vs	1005	998	7	36.9	100	β_{ring} (78) (<i>trigonal ring breaching</i>)
21 952 s	954 w	956	954	36	3.2	9	$\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$ (+22), $\nu(\text{C}_3\text{-F})$ (-13), $\nu(\text{C}_1\text{-N})$ (+11), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$ (+10)

22	ov		871	852	4	0.1	0	$\gamma\text{C}_4\text{H}$ (+49), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (-43), $\gamma\text{C}_2\text{H}$ (+10)
23	842 s	845 vw	871	836	36	0.1	0	$\gamma\text{C}_2\text{H}$ (+85), $\gamma(\text{C}_1\text{N})$ (-16), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (+11)
24	768 s	767 w	775	761	49	0.6	2	$\gamma\text{C}_4\text{H}$ (+37), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (+27), $\gamma\text{C}_5\text{H}$ (+21)
25	742 m	743 s	745	743	6	18.4	72	$\beta_3\text{ring}$ (31), $\beta_1\text{ring}$ (29), $\nu(\text{C-F})$ (12)
26	682 m		727	673	16	0.1	0	$\tau_1\text{ring}$ (89), $\gamma\text{C}_1\text{N}$ (10) (<i>ring puckering mode</i>)
27	592 w	610 vw	607	611	6	1.5	8	$\gamma\text{C}_3\text{F}$ (+40), $\gamma\text{C}_1\text{N}$ (-36), $\tau_3\text{ring}$ (17)
28	533 w	536 m	531	535	11	8.8	51	$\beta_2\text{ring}$ (38), $\beta_3\text{ring}$ (26)
29	516 m	518 w	518	515	5	4.1	25	$\beta_3\text{ring}$ (37), $\beta_2\text{ring}$ (35), $\nu(\text{C}_3\text{-F})$ (11)
30	462 sh	465 vw	463	459	3	0.1	0	$\beta\text{C}_3\text{F}$ (+49), $\beta\text{C}_1\text{N}$ (+35)
31	453 m		451	451	40	0.3	2	$\tau_2\text{ring}$ (73), $\gamma\text{C}_3\text{F}$ (+10), $\gamma\text{C}_1\text{N}$ (+10)
32	355 br		304	306	11	0.0	1	tors NH_2 (68), $\beta\text{C}_1\text{N}$ (+12), $\beta\text{C}_3\text{F}$ (-11)
33	320 w	323 w	320	318	5	1.3	13	$\beta\text{C}_1\text{N}$ (+34), tors NH_2 (30), $\beta\text{C}_3\text{F}$ (-22)
34	244 vw	246 m	236	232	1	2.1	30	$\tau_3\text{ring}$ (77), $\gamma\text{C}_3\text{F}$ (18)
35	228 m	220 sh	219	214	6	0.6	9	$\tau_2\text{ring}$ (32), $\tau_1\text{ring}$ (23), $\gamma\text{C}_1\text{N}$ (22), $\tau_3\text{ring}$ (17)
36	(52.8) ^f		282	490	262	1.3	16	inv NH_2 (83)

^a objaśnienia skrótów: s- silne (strong); m- średnie (medium); w- słabe (weak); br- szerokie (broad); v- bardzo (very); ov – nadton (overtone)

^b Częstości w przybliżeniu anharmonicznym (nieskalowane)

^c Liczby falowe od 1 do 6 w przybliżeniu harmonicznym zostały przeskalowane z użyciem współczynnika skalującego równego 0,958, pozostałe drgania przy użyciu współczynnika 0,983;

^d W tabeli zaznaczono udziały dominujących PED stosując oznaczenia ν - rozciąganie (*stretching mode*); δ - zginanie w płaszczyźnie cząsteczki (*in-plane deformation*); γ - zginanie poza płaszczyznę cząsteczki (*out-of-plane deformation*); τ - drganie deformacyjne (*deformation mode*); overtone – nadton; sciss – drganie nożycowe; rock – drganie wahadłowe; inv – drganie wachlarzowe (inwersja); tors – drganie torsyjne. Faza drania została oznaczona znakiem: plus odpowiada zginaniu w płaszczyźnie (lub poza płaszczyznę) zgodnie z ruchem wskazówek zegara, minus w przeciwnym kierunku.

^e Częstości dla fazy gazowej z [60]. Odpowiadające im częstości dla fazy ciekłej, wynoszą odpowiednio 3461 i 3379 cm^{-1} .

^f Zgodnie z [40] (3FA w fazie gazowej)

Tabela 8. 4-fluoroanilina (4FA). Zestawienie eksperymentalnych (widma IR oraz Ramana) oraz teoretycznych liczb falowych w przybliżeniu anharmonicznym (ω_{anh} , cm^{-1}) i harmonicznym (ω_{h} , cm^{-1}), intensywności pasm teoretycznego widma IR (A^{IR} , km/mol), aktywności ramanowskich (S^{R} , $\text{\AA}^4/\text{amu}$) i teoretycznych intensywności ramanowskich ($I_{\text{anh}}^{\text{R}}$) wraz z rozkładem energii potencjalnej (PED). Obliczenia wykonano metodą B3LYP w bazie 6-311++G(df,pd) [34].

Exp. IR ^a	Exp. R ^a	$\omega_{\text{anh}}^{\text{b}}$	$\omega_{\text{h}}^{\text{c}}$	A^{IR}	S^{R}	$I_{\text{anh}}^{\text{R}}$	PED (%) ^d {faza}; symetria
1 3499 m ^e		3513	3523	17	53.5	13	$\nu_{\text{as}}\text{NH}_2$ (100); A''
2 3414 m ^e	3365 br	3431	3428	19	183.8	47	$\nu_{\text{s}}\text{NH}_2$ (100); A'
	3221 w						overtone $2\nu_7$ (2·1625)
3	3073 m	3063	3066	2	229.7	74	$\nu(\text{C}_3\text{-H})$ (+47), $\nu(\text{C}_5\text{-H})$ (+47); A'
4 3070 sh		3064	3066	4	47.3	15	$\nu(\text{C}_3\text{-H})$ (+48), $\nu(\text{C}_5\text{-H})$ (-48); A''
5 3051 w		3035	3034	9	78.6	26	$\nu(\text{C}_2\text{-H})$ (+48), $\nu(\text{C}_6\text{-H})$ (-48); A''
6 3023 w	3011 w	3025	3034	16	70.3	23	$\nu(\text{C}_2\text{-H})$ (+47), $\nu(\text{C}_6\text{-H})$ (+47); A'
7 1625 m	1625 vw	1623	1637	61	30.7	29	sciss NH_2 (47), $\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (+11), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (+11); A'
8	1608 w	1610	1624	22	3.5	3	sciss NH_2 (52), $\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (-11), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (-11); A'
9	ov	1599	1609	0	2.4	2	$\nu(\text{C}_3\text{-C}_4)$ (+21), $\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$ (-21), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$ (-16), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$ (+16); A''
10 1509 vs	1510 vw	1510	1521	247	0.7	1	$\beta\text{C}_3\text{H}$ (+17), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (-17), $\beta\text{C}_2\text{H}$ (+13), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (-13); A'
11 1435 w	1440 vw	1436	1445	0	0.4	0	$\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (+20), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (-20); A''
12 1321 w		1320	1327	7	0.4	1	$\beta\text{C}_3\text{H}$ (+19), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (+19), rock NH_2 (+13); A''
13	1291 sh	1294	1302	1	3.3	4	$\nu(\text{C-C})$ (total 74); A''
14 1273 m	1275 m	1275	1279	28	21.6	28	$\nu(\text{C}_1\text{-N})$ (+51), $\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (-10), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (-10); A'
15 1223 s	1224 br	1223	1225	161	8.0	11	$\nu(\text{C}_4\text{-F})$ (+42), β_{ring} (14), $\beta\text{C}_2\text{H}$ (+11), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (-11); A'
16 1155 w	1156 m	1160	1161	3	6.8	10	$\beta\text{C}_3\text{H}$ (+25), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (-25), $\beta\text{C}_2\text{H}$ (-13), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (+13); A'
17 1117 w		1125	1123	12	0.0	0	$\beta\text{C}_2\text{H}$ (+23), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (+23), rock NH_2 (18); A''
18 1076 w		1054	1058	3	2.0	3	rock NH_2 (52), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$ (+11), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$ (-11); A''
19 1011 w		1010	1011	1	0.1	0	β_{ring} (42), $\nu(\text{C-C})$ (total 40); A'
20 921 w		989	910	2	0.2	0	$\gamma\text{C}_3\text{H}$ (+37), $\gamma\text{C}_5\text{H}$ (+37), $\gamma\text{C}_2\text{H}$ (-22), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (-22); A'
21 ov		976	935	0	0.0	0	$\gamma\text{C}_3\text{H}$ (+32), $\gamma\text{C}_5\text{H}$ (-32), $\gamma\text{C}_2\text{H}$ (-26), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (+26); A''

22	850 sh	853 vs	842	847	6	45.1	100	$\nu(\text{C-C})$ (total 62), $\beta_2\text{ring}$ (15), $\nu(\text{C}_4\text{-F})$ (10); A'
23	827 s	833 s	849	825	77	1.2	3	$\gamma\text{C}_2\text{H}$ (+27), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (+27), $\gamma(\text{C}_1\text{N})$ (-19), $\gamma\text{C}_4\text{F}$ (-10); A'
24			808	797	0	0.1	0	$\gamma\text{C}_2\text{H}$ (+28), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (-28), $\gamma\text{C}_3\text{H}$ (+21), $\gamma\text{C}_5\text{H}$ (-21); A''
25	749 m		749	750	30	0.1	0	$\beta_1\text{ring}$ (35), $\nu(\text{C}_4\text{-F})$ (+23), $\nu(\text{C}_1\text{-N})$ (-17); A'
26	685 br	700 w	759	688	2	1.5	4	$\tau_1\text{ring}$ (68), $\gamma\text{C}_1\text{N}$ (+19); A' (ring puckering mode)
27	640 w	642 m	649	645	0	6.2	19	$\beta_3\text{ring}$ (72); A''
28	507 s	510 w	493	500	97	0.8	3	$\gamma\text{C}_1\text{N}$ (+25), $\gamma\text{C}_4\text{F}$ (+21), $\tau_3\text{ring}$ (+19); A'
29	460 m	462 s	462	458	2	7.9	35	$\beta_2\text{ring}$ (74); A'
30	435 w	437 w	439	432	2	0.2	1	$\beta\text{C}_4\text{F}$ (+44), $\beta\text{C}_1\text{N}$ (+30), $\beta_3\text{ring}$ (20); A''
31	420 sh		429	419	0	0.0	0	$\tau_2\text{ring}$ (87); A''
32	364 w	367 m	365	353	8	2.8	16	$\gamma\text{C}_4\text{F}$ (+44), $\tau_1\text{ring}$ (38), $\gamma\text{C}_1\text{N}$ (-22); A'
33	340 w	338 w	332	326	0	0.5	3	$\beta\text{C}_1\text{N}$ (+50), $\beta\text{C}_4\text{F}$ (-35); A''
34	280 w		333	259	18	0.2	1	tors NH_2 (100); A''
35		170 m	152	149	1	0.4	6	$\tau_3\text{ring}$ (63), $\tau_2\text{ring}$ (21); A'
36	(31.7) ^f		416	550	240	2.1	11	inv NH_2 (82); A'

^a Objaśnienia skrótów: s- silne (strong); m- średnie (medium); w- słabe (weak); br- szerokie (broad); v- bardzo (very); ov – nadton (overtone)

^b Częstości w przybliżeniu anharmonicznym (nieskalowane)

^c Liczby falowe od 1 do 6 w przybliżeniu harmonicznym zostały przeskalowane z użyciem współczynnika skalującego równego 0,958, pozostałe drgania przy użyciu współczynnika 0,983;

^d W tabeli zaznaczono udziały dominujących PED stosując oznaczenia ν - rozciąganie (*stretching mode*); δ - zginanie w płaszczyźnie cząsteczki (*in-plane deformation*); γ - zginanie poza płaszczyznę cząsteczki (*out-of-plane deformation*); τ - drganie deformacyjne (*deformation mode*); overtone – nadton; sciss – drganie nożycowe; rock – drganie wahadłowe; inv – drganie wachlarzowe (inwersja); tors – drganie torsyjne. Faza drgania została oznaczona znakiem: plus odpowiada zginaniu w płaszczyźnie (lub poza płaszczyznę) zgodnie z ruchem wskazówek zegara, minus w przeciwnym kierunku. A' – drganie symetryczne; A'' – drganie asymetryczne.

^e Częstości dla fazy gazowej z [60]. Odpowiadające im częstości dla fazy ciekłej, wynoszą odpowiednio 3441 i 3361 cm^{-1} .

^f Zgodnie z [40] (4FA w fazie gazowej).

Tabela 9. 4-chloroanilina (4ClA). Zestawienie eksperymentalnych (widma IR oraz Ramana) oraz teoretycznych liczb falowych w przybliżeniu harmonicznym (ω_η , cm^{-1}), intensywności pasm teoretycznego widma IR (A^{IR} , km/mol) i aktywności ramanowskich (S^{R} , $\text{\AA}^4/\text{amu}$) wraz z rozkładem energii potencjalnej (PED). Obliczenia wykonano metodą B3LYP w bazie 6-311++G(df,pd) [7].

	Sym ^a	Exp. IR ^b	Exp. R ^b	ω^c	A^{IR}	S^{R}	PED (%) ^d {faza};
1	A''	3500		3529	19	58.8	$\nu_{\text{as}}\text{NH}_2$ (100)
2	A'	3418		3432	28	217.1	$\nu_{\text{s}}\text{NH}_2$ (100)
3	A'	3058	3059	3067	0	196.0	$\nu(\text{C}_3\text{-H})$ (+47), $\nu(\text{C}_5\text{-H})$ (+47)
4	A''	3043		3066	5	24.1	$\nu(\text{C}_3\text{-H})$ (+48), $\nu(\text{C}_5\text{-H})$ (-48)
5	A'	3037		3033	17	88.5	$\nu(\text{C}_2\text{-H})$ (+47), $\nu(\text{C}_6\text{-H})$ (+47)
6	A''	Ov		3033	9	87.4	$\nu(\text{C}_2\text{-H})$ (+48), $\nu(\text{C}_6\text{-H})$ (-48)
7	A'	1621	1621	1634	125	32.5	sciss NH_2 (80)
8	A'	1597	1602	1613	9	27.8	$\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (+19), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (+18), sciss NH_2 (18)
9	A''	1586		1591	1	0.9	$\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$ (+19), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$ (-19), $\nu(\text{C}_3\text{-C}_4)$ (-18), $\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$ (+18)
10	A'	1500*		1504	159	1.6	$\beta\text{C}_3\text{H}$ (+16), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (-16), $\beta\text{C}_2\text{H}$ (+12), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (-12)
11	A''	1445		1435	1	0.0	$\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (+20), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (-20)
12	A''	1331*		1326	1	0.3	$\beta\text{C}_3\text{H}$ (+21), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (+21)
13	A''	1291		1297	5	1.4	$\nu(\text{C}_3\text{-C}_4)$ (+23), $\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$ (-23)
14	A'	1283	1279	1282	91	13.1	$\nu(\text{C}_1\text{-N})$ (52)
15	A'			1183	16	4.4	$\beta\text{C}_2\text{H}$ (+20), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (-20), $\beta\text{C}_3\text{H}$ (-18), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (+18),
16	A''	1117		1130	10	0.3	$\beta\text{C}_2\text{H}$ (+19), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (+19), rock NH_2 (13)
17	A'	1091	1090	1087	38	28.9	$\nu(\text{C}_3\text{-C}_4)$ (+24), $\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$ (+24), $\nu(\text{C}_4\text{Cl})$ (-19)
18	A''	1055		1056	1	1.6	rock NH_2 (57), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$ (+11), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$ (-11)
19	A'	1009	1002	1008	9	2.4	β_1 ring (83) (<i>trigonal ring breaching</i>)
20	A''	940*	939	944	0	0.0	$\gamma\text{C}_3\text{H}$ (+36), $\gamma\text{C}_5\text{H}$ (-36), $\gamma\text{C}_2\text{H}$ (-22), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (+22)
21	A'	928		924	0	0.0	$\gamma\text{C}_3\text{H}$ (+37), $\gamma\text{C}_5\text{H}$ (+37), $\gamma\text{C}_2\text{H}$ (-22), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (-22)

22	A'	826	826	826	21	23.1	$\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$ (+24), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$ (+24), $\nu(\text{C}_1\text{-N})$ (+14)
23	A'	814*		818	45	11.5	$\gamma\text{C}_2\text{H}$ (+20), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (+20), $\gamma(\text{C}_1\text{N})$ (-17)
24	A''			803	0	0.0	$\gamma\text{C}_2\text{H}$ (+32), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (-32), $\gamma\text{C}_3\text{H}$ (+18), $\gamma\text{C}_5\text{H}$ (-18)
25	A'	699		696	0	0.3	τ_1 ring (88), $\gamma\text{C}_1\text{N}$ (14) (<i>ring puckering mode</i>)
26	A''	633	637	641	0	5.6	β_3 ring (78)
27	A'	642		638	16	0.8	$\nu(\text{C}_4\text{Cl})$ (+36), β_2 ring (+32)
28	A'			524	160	1.9	wag NH_2 (72)
29	A'	495 *		489	200	1.2	$\gamma(\text{C}_1\text{N})$ (+30), wag NH_2 (18), τ_3 ring (17)
30	A''	421		414	0	0.0	τ_2 ring (92)
31	A''	404	407*	400	0	0.9	$\beta\text{C}_1\text{N}$ (+64), $\beta\text{C}_4\text{Cl}$ (+16), β_3 ring (+13)
32	A'	379 *	379*	375	3	10.4	β_2 ring (47), $\nu(\text{C}_4\text{Cl})$ (39)
33	A'	311 *		311	4	0.7	$\gamma\text{C}_4\text{Cl}$ (+50), τ_1 ring (27), $\gamma(\text{C}_1\text{N})$ (-19)
34	A''			287	16	0.2	tors NH_2 (99)
35	A''	242 *		252	0	0.2	$\beta\text{C}_4\text{Cl}$ (72), $\beta\text{C}_1\text{N}$ (16)
36	A'			120	1	0.2	τ_3 ring (72), $\gamma\text{C}_4\text{Cl}$ (24)

^a A' – drganie symetryczne; A'' – drganie asymetryczne.

^b Objasnienia skrótów: ov – nadton (overtone); Dane eksperymentalne zaczerpnięte z [61] oraz jak zaznaczono w [7].

^c Liczby falowe od 1 do 6 w przybliżeniu harmonicznym zostały przeskalowane z użyciem współczynnika skalującego równego 0,958, pozostałe drgania przy użyciu współczynnika 0,983;

^d W tabeli zaznaczono udziały dominujących PED stosując oznaczenia ν - rozciąganie (*stretching mode*); δ - zginanie w płaszczyźnie cząsteczki (*in-plane deformation*); γ - zginanie poza płaszczyznę cząsteczki (*out-of-plane deformation*); τ - drganie deformacyjne (*deformation mode*); overtone – nadton; sciss – drganie nożycowe; rock – drganie wahadłowe; inv – drganie wachlarzowe (inwersja); tors – drganie torsyjne. Faza drgania została oznaczona znakiem: plus odpowiada zginaniu w płaszczyźnie (lub poza płaszczyznę) zgodnie z ruchem wskazówek zegara, minus w przeciwnym kierunku.

* Charakter drgań przypisano ponownie, w odniesieniu do [40, 62].

Tabela 10. 4-bromoanilina (4BrA). Zestawienie eksperymentalnych (widma IR oraz Ramana) oraz teoretycznych liczb falowych w przybliżeniu harmonicznym (ω_η , cm^{-1}), intensywności pasm teoretycznego widma IR (A^{IR} , km/mol) i aktywności ramanowskich (S^{R} , $\text{\AA}^4/\text{amu}$) wraz z rozkładem energii potencjalnej (PED). Obliczenia wykonano metodą B3LYP w bazie 6-311++G(df,pd) [7].

Sym ^a	Exp. IR ^b	Exp. R ^b	ω^c	A^{IR}	S^{R}	PED (%) ^d {faza};
1 A''	3502		3531	20	61.1	$\nu_{\text{as}}\text{NH}_2$ (100)
2 A'	3422 ^e		3433	30	233.6	$\nu_{\text{s}}\text{NH}_2$ (100)
3 A'	Ov		3066	0	184.2	$\nu(\text{C}_3\text{-H})$ (+47), $\nu(\text{C}_5\text{-H})$ (+47)
4 A''	3065*		3065	5	15.4	$\nu(\text{C}_3\text{-H})$ (+48), $\nu(\text{C}_5\text{-H})$ (-48)
5 A'	3036		3032	17	97.1	$\nu(\text{C}_2\text{-H})$ (+47), $\nu(\text{C}_6\text{-H})$ (+47)
6 A''	Ov		3032	10	92.2	$\nu(\text{C}_2\text{-H})$ (+48), $\nu(\text{C}_6\text{-H})$ (-48)
7 A'	1623	1620	1633	131	31.6	sciss NH_2 (84)
8 A'	1596	1596	1610	18	32.7	$\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (+20), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (+17), sciss NH_2 (14)
9 A''	1572		1587	1	0.8	$\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$ (+19), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$ (-19), $\nu(\text{C}_3\text{-C}_4)$ (-17) $\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$ (+17)
10 A'	1489		1500	144	2.5	$\beta\text{C}_3\text{H}$ (+17), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (-17), $\beta\text{C}_2\text{H}$ (+12), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (-12)
11 A''	1425		1432	2	0.0	$\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (+20), $\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$ (-20)
12 A''	1326*		1326	0	0.5	$\beta\text{C}_3\text{H}$ (+24), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (+24)
13 A''	1312*		1297	6	1.0	$\nu(\text{C}_3\text{-C}_4)$ (+25), $\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$ (-25)
14 A'	1278		1283	106	13.0	$\nu(\text{C}_1\text{-N})$ (52)
15 A'	1178	1174	1185	18	8.2	$\beta\text{C}_2\text{H}$ (+20), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (-20), $\beta\text{C}_3\text{H}$ (-19), $\beta\text{C}_5\text{H}$ (+19)
16 A''	1122		1131	9	0.4	$\beta\text{C}_2\text{H}$ (+19), $\beta\text{C}_6\text{H}$ (+19), rock NH_2 (13)
17 A'	1075*	1074*	1070	22	25.6	$\nu(\text{C}_3\text{-C}_4)$ (+28), $\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$ (+28), $\nu(\text{C}_4\text{Br})$ (-12)
18 A''	1050		1055	1	1.3	rock NH_2 (57), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$ (+11), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$ (-11)
19 A'	1006*	1008*	1003	13	3.8	β_{ring} (88) (<i>trigonal ring breaching</i>)
20 A''	946		944	0	0.0	$\gamma\text{C}_3\text{H}$ (+36), $\gamma\text{C}_5\text{H}$ (-36), $\gamma\text{C}_2\text{H}$ (-21), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (+21)
21 A'	923		924	0	0.1	$\gamma\text{C}_3\text{H}$ (+38), $\gamma\text{C}_5\text{H}$ (+38), $\gamma\text{C}_2\text{H}$ (-22), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (-22)
22 A'	831*	830*	823	23	22.4	$\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$ (+24), $\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$ (+24), $\nu(\text{C}_1\text{-N})$ (+14)
23 A'	812*	810*	815	41	13.7	$\gamma\text{C}_2\text{H}$ (+19), $\gamma\text{C}_6\text{H}$ (+19), $\gamma(\text{C}_1\text{N})$ (-16)

24 A''		804	0	0.0	γ_{C_2H} (+32), γ_{C_6H} (-32), γ_{C_3H} (+17), γ_{C_5H} (-17)
25 A'	691	687	1	0.3	τ_1 ring (89), γ_{C_1N} (15) (<i>ring puckering mode</i>)
26 A''	630 635	639	0	4.9	β_3 ring (79)
27 A'	602*	603	8	0.9	β_2 ring (45), $\nu(C_4Br)$ (25)
28 A'		518	150	1.7	wag NH ₂ (54), $\gamma(C_1N)$ (14)
29 A'	495	484	212	1.4	wag NH ₂ (40), $\gamma(C_1N)$ (23), τ_3 ring (17)
30 A''	408	410	0	0.0	τ_2 ring (97)
31 A''	392	393	0	0.7	β_{C_1N} (+70), β_{C_4Br} (+11), β_3 ring (+10)
32 A'	309*	295	3	1.3	γ_{C_4Br} (+48), τ_1 ring (23), $\gamma(C_1N)$ (-19)
33 A''		292	16	0.2	tors NH ₂ (99)
34 A'	292*	286	1	8.3	$\nu(C_4Br)$ (58), β_2 ring (31)
35 A''		211	0	0.1	β_{C_4Br} (80), β_{C_1N} (10)
36 A'		106	2	0.8	τ_3 ring (64), γ_{C_4Br} (33)

^a A' – drganie symetryczne; A'' – drganie asymetryczne.

^b Objasnienia skrótów: ov – nadton (overtone); Dane eksperymentalne zaczerpnięte z [61] oraz jak zaznaczono w [7].

^c Liczby falowe od 1 do 6 w przybliżeniu harmonicznym zostały przeskalowane z użyciem współczynnika skalującego równego 0,958, pozostałe drgania przy użyciu współczynnika 0,983;

^d W tabeli zaznaczono udziały dominujących PED stosując oznaczenia ν - rozciąganie (*stretching mode*); δ - zginanie w płaszczyźnie cząsteczki (*in-plane deformation*); γ - zginanie poza płaszczyznę cząsteczki (*out-of-plane deformation*); τ - drganie deformacyjne (*deformation mode*); overtone – nadton; sciss – drganie nożycowe; rock – drganie wahadłowe; inv – drganie wachlarzowe (inwersja); tors – drganie torsyjne. Faza drgania została oznaczona znakiem: plus odpowiada zginaniu w płaszczyźnie (lub poza płaszczyznę) zgodnie z ruchem wskazówek zegara, minus w przeciwnym kierunku.

* Charakter drgań przypisano ponownie, w odniesieniu do [40, 62].

Tabela 11. 2,3,4,5,6-pentafluoroanilina (PFA). Zestawienie eksperymentalnych (widma IR oraz Ramana) oraz teoretycznych liczb falowych w przybliżeniu anharmonicznym (ω_{anh} , cm^{-1}) i harmonicznym (ω_{h} , cm^{-1}), intensywności pasm teoretycznego widma IR (A^{IR} , km/mol), aktywności ramanowskich (S^{R} , $\text{\AA}^4/\text{amu}$) i teoretycznych intensywności ramanowskich ($I_{\text{anh}}^{\text{R}}$) wraz z rozkładem energii potencjalnej (PED). Obliczenia wykonano metodą B3LYP w bazie 6-311++G(df,pd) [35].

	Exp. IR ^a	Exp. R ^a	$\omega_{\text{anh}}^{\text{b}}$	$\omega_{\text{h}}^{\text{c}}$	A^{IR}	S^{R}	$I_{\text{anh}}^{\text{R}}$	PED (%) ^d {faza}; symetria
1	3515 s	3516 w	3545.6	3549.2	50.4	40.2	7.6	$\nu_{\text{as}}\text{NH}_2$ (100); A''
2	3419 s	3420 m	3450.5	3444.0	66.1	158.0	31.8	$\nu_{\text{s}}\text{NH}_2$ (100); A'
3	1671 s	1670 m	1661.7	1661.1	51.7	44.5	31.9	$\nu(\text{C-C})$ (65); sciss NH_2 (10); $\beta_2\text{ring}$ (10); A'
4		1613 w	1610.4	1628.9	2.6	2.1	1.6	$\nu(\text{C-C})$ (72); $\beta_3\text{ring}$ (11), βCF (10); A''
5	1609 s		1595.3	1612.8	59.4	0.8	0.6	sciss NH_2 (87); $\nu(\text{C-C})$ (10); A''
6			1512.0	1517.7	329.3	0.1	0.1	$\nu(\text{C-C})$ (52); $\nu(\text{C-F})$ (28); A''
7	1520 vs,br	1521 w	1512.7	1517.5	388.8	1.1	0.9	$\nu(\text{C-C})$ (54); $\nu(\text{C}_4\text{-F})$ 13(-); $\nu(\text{C}_1\text{-N})$ 12(+); A'
8	1483 vw	1480 w	1473.9	1478.1	0.2	4.7	4.0	$\nu(\text{C}_1\text{-N})$ (17); $\nu(\text{C-F})$ (46); $\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$ (34); A'
9		1309 w	1317.7	1317.3	3.7	3.1	3.0	$\nu(\text{C-C})$ (86); rock NH_2 (12); A'' (Kekulé mode)
10	1309 m		1310.9	1304.5	3.5	0.5	0.5	$\beta_1\text{ring}$ (38); $\nu(\text{C-F})$ (53); A'
11	1172 s		1157.0	1168.7	93.1	0.4	0.5	rock NH_2 (44); $\nu(\text{C}_2\text{-F})$ (18); $\nu(\text{C}_6\text{-F})$ (18); A''
12		1157 w	1159.3	1158.3	0.8	3.2	3.8	$\nu(\text{C-F})$ (52); $\nu(\text{C}_1\text{-N})$ (28); $\nu(\text{C-C})$ (14); A'
13	1123 s		1117.7	1121.8	54.7	0.0	0.0	$\nu(\text{C-F})$ (64); rock NH_2 (14); $\nu(\text{C-C})$ (14); A''
14	1001 vs		1008.2	1003.2	227.4	0.3	0.4	$\nu(\text{C-F})$ (47); βCF (20); $\nu(\text{C-C})$ (18); $\nu(\text{C}_1\text{-N})$ (15); A'
15	943 vs		940.4	945.2	166.4	0.3	0.5	$\nu(\text{C-F})$ (50); rock NH_2 13(-); $\beta\text{C}_4\text{F}$ (17); $\nu(\text{C-C})$ (20); A''
16			756.8	755.9	0.0	0.0	0.1	βCF (77); $\beta\text{C}_1\text{N}$ (14); A''
17			703.5	647.1	0.3	0.9	2.0	$\gamma(\text{C}_1\text{N})$ (60); γCF (40); A'
18			674.3	622.1	0.0	0.0	0.1	γCF (100); A''
19	615 m	611 w	598.8	599.2	12.0	2.8	7.8	$\beta_1\text{ring}$ (56); $\nu(\text{C-F})$ (29); A'

20			1073.0	584.8	0.4	1.0	1.4	$\gamma\text{C}_4\text{F}$ (+28); $\gamma\text{C}_3\text{F}$ (-22); $\gamma\text{C}_5\text{F}$ (-22); $\tau_1\text{ring}$ (-10); $\gamma(\text{C}_1\text{N})$ (-8); $\gamma\text{C}_2\text{F}$ (+5); $\gamma\text{C}_6\text{F}$ (+5); A'
21	560 m	563 vvs	558.8	556.1	1.4	32.4	100	$\nu(\text{C-C})$ (61); $\nu(\text{C}_4\text{-F})$ (31); A' (<i>ring breathing</i>)
22			207.0	461.7	278.6	3.0	40.1	inv NH_2 (91); A'
23	448 s		434.8	444.2	9.4	4.2	18.5	$\beta_2\text{ring}$ (63); A'
24		448 vs	447.3	443.4	0.0	5.3	22.0	$\beta_3\text{ring}$ (67); A''
25	395 vw ^e	397 s, br	398.5	386.8	2.0	2.0	10.1	$\gamma\text{C}_2\text{F}$ (22); $\gamma\text{C}_6\text{F}$ (22); tors NH_2 (22); $\gamma\text{C}_3\text{F}$ (17); $\gamma\text{C}_5\text{F}$ (17); A''
26		354 s, br	355.9	339.0	6.5	1.7	10.1	$\gamma\text{C}_4\text{F}$ (36); $\gamma(\text{C}_1\text{N})$ (20); $\gamma\text{C}_2\text{F}$ (11); $\gamma\text{C}_6\text{F}$ (11); $\gamma\text{C}_3\text{F}$ (10); $\gamma\text{C}_5\text{F}$ (10); A'
27	347 w ^e		363.3	334.2	8.2	1.2	6.7	tors NH_2 (71); γCF (22); A''
28	322 w ^e		321.3	318.7	1.5	0.0	0.3	βCF (68); $\nu(\text{C-C})$ (29); A'
29	305 vw ^e		306.8	304.6	0.1	0.0	0.3	βCF (61); $\nu(\text{C-C})$ (25); A''
30	284 m ^e	288 vw	282.9	281.6	4.8	0.2	1.4	βCF (52); $\beta\text{C}_1\text{N}$ (42); A''
31			275.2	272.4	0.1	0.1	1.2	βCF (82); $\beta_2\text{ring}$ (16); A'
32	268 w ^e	273 vw	269.8	266.9	1.9	0.4	3.4	βCF (68); $\beta_3\text{ring}$ (14); $\beta\text{C}_1\text{N}$ (13); A''
33	218 m ^e	224 w	211.9	206.1	1.1	0.3	4.0	γCF (89); $\gamma(\text{C}_1\text{N})$ (11); A'
34	202 w ^e	202w,br	184.1	184.0	0.9	0.2	3.0	$\tau_1\text{ring}$ (90); A' (<i>ring puckering mode</i>)
35			135.7	134.6	0.0	0.0	0.1	$\tau_2\text{ring}$ (80); $\tau_3\text{ring}$ (20); A''
36	152 w ^e	153 w	133.2	132.6	1.6	0.3	9.6	$\tau_3\text{ring}$ (80); $\tau_2\text{ring}$ (20); A'

^a Objaśnienia skrótów: s- silne (strong); m- średnie (medium); w- słabe (weak); br- szerokie (broad); v- bardzo (very).

^b Częstości drgań w przybliżeniu anharmonicznym (nieskalowane)

^c Liczby falowe od 1 do 6 w przybliżeniu harmonicznym zostały przeskalowane z użyciem współczynnika skalującego równego 0,958, pozostałe drgania przy użyciu współczynnika 0,983;

^d W tabeli zaznaczono udziały dominujących PED stosując oznaczenia ν - rozciąganie (*stretching mode*); δ - zginanie w płaszczyźnie cząsteczki (*in-plane deformation*); γ - zginanie poza płaszczyznę cząsteczki (*out-of-plane deformation*); τ - drganie deformacyjne (*deformation mode*); overtone – nadton; sciss – drganie nożycowe; rock – drganie wahadłowe; inv – drganie wachlarzowe (inwersja); tors – drganie torsyjne. Faza drania została oznaczona znakiem: plus odpowiada zginaniu w płaszczyźnie (lub poza płaszczyznę) zgodnie z ruchem wskazówek zegara, minus w przeciwnym kierunku. A' – drganie symetryczne; A'' – drganie asymetryczne.

^e Dane uzyskano na podstawie widma ATR-FT-IR (*Attenuated Total Reflectance FT-IR*) zmierzonego dla warstwy PFA naniesionej na powierzchnię diamentu, przy użyciu spektrofotometru FT-IR Vertex 70v firmy Bruker z rozdzielczością 4 cm^{-1} . Pomiar wykonano w Zintegrowanym Wydziałowym Laboratorium Inżynierii i Badania Materiałów Zaawansowanych na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej.

Table 12. Współrzędne wewnętrzne używane w analizie drgań normalnych.

No	Definicja współrzędnych wewnętrznych	Opis drgania	Symbol
S1	$r_{1,2}$	Rozciąganie (C ₁ -C ₂)	$\nu(\text{C}_1\text{-C}_2)$
S2	$r_{2,3}$	Rozciąganie (C ₂ -C ₃)	$\nu(\text{C}_2\text{-C}_3)$
S3	$r_{3,4}$	Rozciąganie (C ₃ -C ₄)	$\nu(\text{C}_3\text{-C}_4)$
S4	$r_{4,5}$	Rozciąganie (C ₄ -C ₅)	$\nu(\text{C}_4\text{-C}_5)$
S5	$r_{5,6}$	Rozciąganie (C ₅ -C ₆)	$\nu(\text{C}_5\text{-C}_6)$
S6	$r_{1,6}$	Rozciąganie (C ₁ -C ₆)	$\nu(\text{C}_1\text{-C}_6)$
S7	$r_{2,8}$	Rozciąganie (C ₂ -X ₈)	$\nu(\text{C}_2\text{-X})$
S8	$r_{3,9}$	Rozciąganie (C ₃ -X ₉)	$\nu(\text{C}_3\text{-X})$
S9	$r_{4,10}$	Rozciąganie (C ₄ -X ₁₀)	$\nu(\text{C}_4\text{-X})$
S10	$r_{5,11}$	Rozciąganie (C ₅ -X ₁₁)	$\nu(\text{C}_5\text{-X})$
S11	$r_{6,12}$	Rozciąganie (C ₆ -X ₁₂)	$\nu(\text{C}_6\text{-X})$
S12	$r_{1,7}$	Rozciąganie (C ₁ -N ₇)	$\nu(\text{C}_1\text{-N})$
S13	$6^{-1/2}(\beta_{2,6,1}-\beta_{1,3,2}+\beta_{4,2,3}-\beta_{5,3,4}+\beta_{6,4,5}-\beta_{5,1,6})$	Deformacja pierścienia #1	$\beta_{1\text{ring}}^b$
S14	$12^{-1/2}(2\cdot\beta_{2,6,1}-\beta_{3,2,1}-\beta_{4,3,2}+2\cdot\beta_{3,5,4}-\beta_{6,4,5}-\beta_{1,5,6})$	Deformacja pierścienia #2	$\beta_{2\text{ring}}$
S15	$\frac{1}{2}(\beta_{1,3,2}-\beta_{2,4,3}+\beta_{4,6,5}-\beta_{1,5,6})$	Deformacja pierścienia #3	$\beta_{3\text{ring}}$
S16	$2^{-1/2}(\beta_{1,8,2}-\beta_{3,8,2})$	Zginanie w płaszczyźnie $\beta_{\text{C}_2\text{X}_8}$	$\beta_{\text{C}_2\text{X}}$
S17	$2^{-1/2}(\beta_{2,9,3}-\beta_{4,9,3})$	Zginanie w płaszczyźnie $\beta_{\text{C}_3\text{X}_9}$	$\beta_{\text{C}_3\text{X}}$
S18	$2^{-1/2}(\beta_{3,10,4}-\beta_{5,10,4})$	Zginanie w płaszczyźnie $\beta_{\text{C}_4\text{X}_{10}}$	$\beta_{\text{C}_4\text{X}}$
S19	$2^{-1/2}(\beta_{4,11,5}-\beta_{6,11,5})$	Zginanie w płaszczyźnie $\beta_{\text{C}_5\text{X}_{11}}$	$\beta_{\text{C}_5\text{X}}$
S20	$2^{-1/2}(\beta_{5,12,6}-\beta_{1,12,6})$	Zginanie w płaszczyźnie $\beta_{\text{C}_6\text{X}_{12}}$	$\beta_{\text{C}_6\text{X}}$
S21	$2^{-1/2}(\beta_{6,7,1}-\beta_{2,7,1})$	Zginanie w płaszczyźnie $\beta_{\text{C}_1\text{N}_7}$	$\beta_{\text{C}_1\text{N}}$
S22	$\gamma_{8,1,2,3}$	Zginanie poza płaszczyzną X ₈	$\gamma_{\text{C}_2\text{X}}$
S23	$\gamma_{9,2,3,4}$	Zginanie poza płaszczyzną X ₉	$\gamma_{\text{C}_3\text{X}}$
S24	$\gamma_{10,3,4,5}$	Zginanie poza płaszczyzną X ₁₀	$\gamma_{\text{C}_4\text{X}}$
S25	$\gamma_{11,4,5,6}$	Zginanie poza płaszczyzną X ₁₁	$\gamma_{\text{C}_5\text{X}}$
S26	$\gamma_{12,5,6,1}$	Zginanie poza płaszczyzną X ₁₂	$\gamma_{\text{C}_6\text{X}}$
S27	$6^{-1/2}(\tau_{1,2,3,4}-\tau_{2,3,4,5}+\tau_{3,4,5,6}-\tau_{4,5,6,1}+\tau_{5,6,1,2}-\tau_{6,1,2,3})$	Drganie torsyjne pierścienia #1 ^c	$\tau_{1\text{ring}}$
S28	$\frac{1}{2}(\tau_{1,2,3,4}-\tau_{3,4,5,6}+\tau_{4,5,6,1}-\tau_{6,1,2,3})$	Drganie torsyjne pierścienia #2	$\tau_{2\text{ring}}$
S29	$12^{-1/2}(-\tau_{1,2,3,4}+2\cdot\tau_{2,3,4,5}-\tau_{3,4,5,6}-\tau_{4,5,6,1}+2\cdot\tau_{5,6,1,2}-\tau_{6,1,2,3})$	Drganie torsyjne pierścienia #3	$\tau_{3\text{ring}}$
S30	$2^{-1/2}(r_{7,13}+r_{7,14})$	Rozciąganie symetryczne NH ₂	$\nu_s\text{NH}_2$
S31	$2^{-1/2}(r_{7,13}-r_{7,14})$	Rozciąganie asymetryczne NH ₂	$\nu_{as}\text{NH}_2$
S32	$6^{-1/2}(2\cdot\beta_{13,14,7}-\beta_{13,1,7}-\beta_{14,1,7})$	Drganie nożycowe NH ₂ (β_s)	sciss NH ₂
S33	$2^{-1/2}(\beta_{13,1,7}-\beta_{14,1,7})$	Drganie wahadłowe NH ₂ (β_{as})	rock NH ₂
S34	$\gamma_{7,6,1,2}$	Deformacja poza płaszczyzną N ₇	$\gamma(\text{C}_1\text{N})$
S35	$\gamma_{1,13,7,14}$	Drganie wachlarzowe NH ₂ (inwersja grupy NH ₂)	inv NH ₂
S36	$\frac{1}{2}(\tau_{13,7,1,6}+\tau_{13,7,1,2}+\tau_{14,7,1,6}+\tau_{14,7,1,2})$	Drganie skręcające NH ₂ (drżanie torsyjne NH ₂) ^d	tors NH ₂

^a $r_{i,j}$ odległość pomiędzy atomami i oraz j ; $\beta_{i,j,k}$ kąt płaski pomiędzy wektorami $k-i$ oraz $k-j$; $\gamma_{i,j,k,l}$ kąt płaski pomiędzy wektorem $k-i$ oraz płaszczyzną zdefiniowaną przez atomy j,k,l ; $\tau_{i,j,k,l}$ kąt dwuścienny pomiędzy płaszczyzną określoną przez atomy i,j,k oraz płaszczyzną zdefiniowaną przez atomy j,k,l .

^b oddychanie pierścienia (*trigonal ring "breathing" vibration*).

^c "falowanie" pierścienia (*ring puckering mode*)

^d w literaturze drżanie skręcające grupy NH₂ oznaczane jest także jako twist HN₂.

1.5.3.1 Rodnik kationowy aniliny.

Ze względu na specyficzne właściwości rodnika kationowego aniliny, wynikające ze zmiany struktury elektronowej i geometrii cząsteczki, korzystnie rodnik aniliny opisać osobno, podkreślając charakterystyczne różnice w widmie oscylacyjnym w stosunku do neutralnej aniliny.

Jak wspomniano, podczas jonizacji aniliny następuje utworzenie formy typowej dla chinonów oraz zmiana geometrii cząsteczki, powodująca jej spłaszczenie oraz zmianę grupy symetrii z C_s na C_{2v} . Zwiększenia oddziaływania pomiędzy grupą NH_2 i pierścieniem w A^+ powoduje skrócenie długości wiązania C1-N o ponad $0,06\text{\AA}$ oraz zwiększenie częstości (*blue-shift*) przypisaną drganiu rozciągającemu $\nu(C1-N)$.

Zgodnie z analizą rozkładu energii potencjalnej PED dla aniliny, drganie rozciągające $\nu(C1-N)$ ma dominujący udział (51%) w drganiu normalnym numer 15. Drganie to jest obserwowane przy częstości 1282 cm^{-1} w widmie w podczerwieni (pomiar w matrycy argonowej [58]). Wyznaczona teoretycznie liczba falowa odpowiadająca drganiu $\nu(C1-N)$ wynosi 1280 cm^{-1} pozostaje w bardzo dobrej zgodności z wynikami pomiarów. Dla rodnika kationowego aniliny, wyznaczona częstość drgania numer 15 wzrasta do 1375 cm^{-1} , przy jednoczesnym radykalnym osłabieniu intensywności drgania w widmie w podczerwieni (rysunek 7). Z drugiej strony intensywność tego drgania normalnego w widmie Ramana dla kationu rodnikowego aniliny jest blisko trzykrotnie wyższa, niż dla aniliny (rysunek 8). W oparciu o te dane, linia widma o liczbie falowej 1385 cm^{-1} raportowana przez Song i wsp. [63], została przypisana drganiu normalnemu nr 14 dla A^+ . Należy podkreślić, że liczba falowa wyznaczona dla tego drgania w oparciu o obliczenia metodą UMP2 w bazie 6-31G* została przeszacowana o około 70 cm^{-1} [63], w stosunku do danych eksperymentalnych.

Znaczący udział drgania rozciągającego $\nu(C1-N)$ dla A^+ obserwowany jest także dla drgań normalnych numer 11 oraz 25. Drganie normalne nr 11 jest praktycznie nie obserwowane w widmie IR dla aniliny, natomiast w przypadku rodnika kationowego aniliny daje wyraźny sygnał przy częstości 1483 cm^{-1} [58, 59]. Drganie to związane jest z ruchem rozciągającym C-N (23% PED) oraz z drganiami zginającymi C-H w płaszczyźnie pierścienia aromatycznego (tabela 5). Częstość wyznaczona teoretycznie dla drgania nr 11, 1191 cm^{-1} , jest bardzo bliska wartości eksperymentalnej. Należy także zaznaczyć, iż drganie normalne nr 11 obserwowane jest także jako linia o dużej intensywności w widmie Ramana. (rysunek 8). Nieznacznie mniejszy wkład drgania

rozciągającego $\nu(\text{C1-N})$ na poziomie 18% PED obserwowany jest dla drgania normalnego numer 25 dla kationu rodnikowego aniliny*.

Zgodnie z obliczeniami dla A^+ , drganie zginające C1-N w płaszczyźnie zostało przypisane drganiu normalnemu numer 34 o liczbie falowej 383 cm^{-1} . Pozostaje to w bardzo dobrej zgodności z częstością eksperymentalną, 386 cm^{-1} , zmierzona przez Piesta i współl. [59]. Wyniki te jednoznacznie podważają wcześniejsze przypisanie drgania zginającego C1-N linii widma o częstości 550 cm^{-1} [63].

Pozapłaszczyznowemu drganiu zginającemu C1-N towarzyszy ruch torsyjny pierścienia (drgania własne numer 27, 32 i 36). Dla aniliny częstości wyznaczone teoretycznie odpowiadające tym drganiom wynoszą odpowiednio 752 , 489 i 217 cm^{-1} i zbliżone są do częstości wyznaczonych eksperymentalnie 755 , 501 i 217 cm^{-1} [58, 64]. Dla A^+ wyznaczona teoretycznie liczba falowa odpowiadająca drganiu własnemu numer 36 (181 cm^{-1}), bardzo dobrze koreluje z danymi eksperymentalnymi (179 cm^{-1}). Także dwie pozostałe wyznaczone teoretycznie liczby falowe odpowiadające drganiom zginającym C1-N poza płaszczyznę znakomicie odzwierciedlają dane eksperymentalne (tabela 5). Należy podkreślić, że wcześniejsze przypisanie omawianemu drganiu własnemu częstości 577 cm^{-1} , w widmie rodnika kationowego aniliny [63], było błędne.

Jonizacja aniliny, poprzez tworzenie formy typowej dla chinonów (symetryczne skrócenie wiązań C2-C3 oraz C5-C6), wpływa także na zmianę drgań normalnych charakteryzujących drgania atomów pierścienia aromatycznego. Drganie normalne numer 28, odpowiada drganiu pozapłaszczyznowemu, w którym co drugi z atomów pierścienia unosi się ponad płaszczyznę cząsteczki, a co drugi z atomów węgla opada poniżej tej płaszczyzny (ang. *ring puckering vibration*)[†]. Zgodnie z obliczeniami na poziomie B3LYP dla aniliny, teoretyczna liczba falowa przypisana temu drganiu wynosi 689 cm^{-1} , co znakomicie odzwierciedla dane eksperymentalne, 688 cm^{-1} [58]. Dla rodnika kationowego aniliny, wyznaczona teoretycznie częstość odpowiadająca drganiu $\tau_1\text{ring}$ wynosi 626 cm^{-1} , co także pozostaje w dobrej zgodności z danymi doświadczalnymi (622 cm^{-1} [59]). Warto jednak odnotować kilka błędnych przyporządkowań dotyczących powyższego drgania. Takahashi i współl. [66] dla widma rodnika kationowego aniliny, błędnie przyporządkowali linię widma o częstości 628 cm^{-1} , pierwszemu nadtonowi drgania wachlarzowego grupy

* Jak pokazano w [33], wcześniejsze przypisanie drgania rozciągającego $\nu(\text{C1-N})$ dwóm drganiom normalnym nr 25 (1) i 26 (10a), raportowane przez Evansa [64] i cytowane przez innych autorów [65], należy uznać za niewłaściwe.

[†] W tabeli 12, opisywane drganie zostało oznaczone jako $\tau_1\text{ring}$.

NH₂. Song i współ. [63] nie trafnie przyporządkowali linie widma o częstościach 629 i 445 cm⁻¹ drganiom numer 32 (16b) i 28 (4).

Drganie normalne numer 21, określane jest jako oddychanie pierścienia (*trigonal ring "breathing" vibration*) i odpowiada drganiu nr. 12 zgodnie z notacją Wilsona dla drgań pierścienia benzenowego [57]. Natomiast drganie normalne numer 20 odpowiada symetrycznemu rozciąganiu C-C połączonemu z ruchem zginającym w płaszczyźnie C-H (18a). Na podstawie pomiarów w matrycy argonowej dla aniliny, drgania te zostały przypisane częstościom 1028 i 996 cm⁻¹. Obydwa drgania są bardzo słabo obserwowane w widmie w podczerwieni, jednakże w widmie Ramana dają silny sygnał (rys. 7 i 8). W widmie IR dla A⁺ omawiane drgania normalne numer 20 i 21, zostały przypisane liniom widma o częstościach 993 [59] oraz 982 cm⁻¹ [63], i w pełni odpowiadają wyznaczonym teoretycznie liczbom falowym (992 i 979 cm⁻¹). Jest intrygującym, iż intensywności drgań własnych numer 20 i 21 w widmie Ramana dla A są „odwrotne” niż dla A⁺ (tabele 4 i 5 oraz rysunek 8).

Drganie charakterystyczne numer 14 określane jest jako drganie Kekulégo (*Kekulé-type vibration*) i związane jest z naprzemiennym rozciąganiem i skracaniem wiązań C-C w pierścieniu benzenowym. Obliczona metodą B3LYP częstość tego drgania wynosi 1323 cm⁻¹ i znakomicie odpowiada częstości doświadczalnej wyznaczonej dla aniliny (1324 cm⁻¹ [64]). Także dla rodnika kationowego aniliny wyniki obliczeń teoretycznych opisujących omawiane drganie (1361 cm⁻¹), znakomicie odzwierciedlają wartości eksperymentalne (1360 cm⁻¹ [59]).

Linia o wysokiej intensywności w widmie Ramana dla A⁺ obserwowana jest przy częstości 1594 cm⁻¹ i związana jest głównie z symetrycznym rozciąganiem wiązań C2-C3 oraz C5-C6, w kierunku równoległym do osi cząsteczki przechodzącej przez atomy N7, C1, C4 i H10. „Chinoidowy” charakter rodnika kationowego aniliny powoduje, iż intensywność tego drgania w widmie Ramana jest czterokrotnie wyższa, niż dla komplementarnego drgania o częstości 1608 cm⁻¹ dla cząsteczki neutralnej aniliny A.

Wcześniejsze przypisanie liczb falowych opisujących drgania rozciągające C-H poszczególnym drganiom normalnym dla aniliny można uznać za wątpliwe [33]. W pracy częstości odpowiadające drganiom rozciągającym C-H wyznaczone metodą B3LYP w bazie 6-311++G(*df,pd*) przeskalowano przy użyciu współczynnika 0,958 odzwierciedlającego anharmoniczny charakter drgań $\nu(\text{C-H})$. Zastosowana procedura spowodowała ponowne przypisanie drgań normalnych od numeru 3 do 7 (tabela 4). W przypadku rodnika kationowego aniliny, drgania normalne numer 3-7 wykazują

przesunięcie w kierunku wyższych częstotliwości o około 30 cm^{-1} , przy dramatycznym spadku intensywności drgań obserwowanych w widmie w podczerwieni (rysunek 7). Jednocześnie wszystkie drgania normalne numer 3-7 dla A i A^+ są wyraźnie obserwowane w widmie Ramana (rysunek 8). Przesunięcie w kierunku „niebieskiego zakresu widma” (*blue-shift*) częstotliwości drgań rozciągających C-H sugeruje wzmocnienie wiązań C-H w kationie rodnikowym aniliny. Efekt ten potwierdza analiza NBO, pokazując wzrost gęstości elektronowej na wszystkich orbitalach antywiązących σ_{CH}^* NBO podczas jonizacji aniliny [33].

1.5.3.2 Drgania grupy NH_2

Częstotliwości drgań rozciągających NH_2 dla aniliny zostały określone na podstawie pomiarów spektroskopowych w podczerwieni na 3422 cm^{-1} dla rozciągania symetrycznego $\nu_{\text{s}}\text{NH}_2$ oraz 3508 cm^{-1} dla rozciągania antysymetrycznego $\nu_{\text{as}}\text{NH}_2$ [41]. Jak pokazano w tabeli 4 dla drgań nr 1 i 2, częstotliwości wyznaczone teoretycznie bardzo dobrze odzwierciedlają wartości eksperymentalne. W przypadku kationu rodnikowego aniliny częstotliwości teoretyczne także bardzo dobrze korelują z częstotliwościami teoretycznymi i wynoszą odpowiednio 3395 oraz 3488 cm^{-1} . Z pomiarów Makanagi i współ. [41] wynika, iż linie absorpcyjne N-H w widmie w podczerwieni posiadają o wiele większą intensywność, niż dla aniliny. Efekt ten odzwierciedlają obliczenia na poziomie B3LYP zgodnie z którymi intensywności odpowiadające drganiom rozciągającym N-H dla kationu rodnikowego aniliny, są o wiele wyższe niż dla aniliny (rysunek 7, drgania nr 1 i 2). Przesunięcie ku podczerwieni częstotliwości odpowiadającym drganiom $\nu_{\text{s}}\text{NH}_2$ i $\nu_{\text{as}}\text{NH}_2$ o około $20\text{-}30\text{ cm}^{-1}$ wskazuje na osłabienie wiązań N-H podczas jonizacji aniliny. Potwierdza to analiza NBO wskazująca na wzrost gęstości elektronowej na orbitalu antywiązącym NBO σ_{NH}^* w A^+ [33]. Odmienne efekty, związane z przesunięciem drgań rozciągających NH_2 w kierunku wyższych częstotliwości obserwowany jest dla 2FA, 3FA i PFA. Zgodnie z tabelą 1, kąt dwuścienny γ pomiędzy płaszczyzną określoną przez atomy grupy aminowej, a płaszczyzną pierścienia jest niższy dla 2FA, 3FA oraz PFA jest niższy niż dla aniliny i pozostałych omawianych w rozdziale pochodnych aniliny. Jak pokazano w [34] przesunięcie ku fioletowi częstotliwości drgań rozciągających grupy aminowej w fluoropochodnych aniliny, związane jest ze spłaszczeniem grupy C-NH₂ w 2FA, 3FA oraz PFA. Im bardziej płaska jest grupa C-NH₂ w halogenopochodnych aniliny, tym

wyższe są częstości obydwu drgań rozciągających grupy aminowej. Należy podkreślić, iż wyniki pomiarów spektroskopowych IR-UV dla fluoropochodnych aniliny w fazie gazowej, bardzo dobrze korelują z częstości drgań rozciągających NH_2 prezentowanymi w tabelach 6-8. Podobny efekt zaobserwowano także dla amino pochodnych izoksazolu [67, 68], w których silne oddziaływanie $LP_{\text{N}} \rightarrow \pi^*_{\text{CC}}$ prowadzi do obniżenia piramidalizacji grupy aminowej oraz spłaszczenia cząsteczki*.

Drganie nożycowe grupy NH_2 (sciss NH_2) obserwowane jest w połączeniu z drganiami rozciągającymi C-C pierścienia aromatycznego w drganiach numer: 8 i 9 dla aniliny; 7 i 8 dla monofluoroanilin oraz 8 dla rodnika kationowego aniliny w zakresie częstości od 1596 cm^{-1} (4BrA) do 1671 cm^{-1} (5FA). W przypadku PFA, przesunięcie ku wyższym liczbom falowym drgania nożycowego numer 3 związane jest z parą oddziaływań: $\text{N-H}_{13} \cdots \text{F}_8$ oraz $\text{N-H}_{14} \cdots \text{F}_{12}$. Znacznie słabszy efekt związany „pojedynczym” oddziaływaniem $\text{N-H} \cdots \text{F}$ obserwowany jest dla 2FA, gdzie dla drgania numer 7 obserwowane jest przesunięcie ku wyższym częstości o około 8 cm^{-1} w stosunku do innych monofluoroanilin [34]. Należy podkreślić, iż dominujący udział drgania nożycowego grupy NH_2 (powyżej 50% PED) obserwowany jest jako linia o dużej intensywności w widmie w podczerwieni, w węższym zakresie od 1604 cm^{-1} (2FA) do 1623 cm^{-1} (BrA) dla pochodnych aniliny oraz 1635 cm^{-1} w przypadku rodnika kationowego aniliny[†]. Zakres ten jest charakterystyczny dla drgania nożycowego grupy NH_2 w halogenopochodnych aniliny, a obliczenia na poziomie DFT w pełni odzwierciedlają dużą intensywność drgań[‡].

Zgodnie z wynikami pomiarów dla monofluoroanilin obserwowane jest charakterystyczne pasmo absorpcji przy częstości około 3220 cm^{-1} [34]. Pasma to jest nadtonem drgania nożycowe grupy NH_2 numer 7 (sprzężenie Fermiego z drganiem normalnym $\nu_s \text{NH}_2$ [34]).

Częstość drgania wahadłowego grupy NH_2 wyznaczonego teoretycznie zawiera się w przedziale od 1010 cm^{-1} (A^+) do 1157 cm^{-1} (PFA)[§]. Dla większości opisywanych

* Przykładowo dla cząsteczki 5-amino-3-metylo-1,2-izoksazolo-4-karbozydrazyny kąt dwuścienny γ pomiędzy płaszczyzną grupy NH_2 a płaszczyzną układu aromatycznego wynosi 30° i jest niższy od obserwowanego dla cząsteczki anilin (Tabela 1).

[†] Przesunięcie ku fioletowi drgania nożycowego w rodniku kationowym aniliny obserwowane jest w doświadczalnym widmie w podczerwieni [58, 59] i spowodowane jest spłaszczeniem cząsteczki (ruch atomów odbywa się w płaszczyźnie cząsteczki).

[‡] Przykładowo w widmie FT-IR dla 3FA obserwowana jest szeroka linia o dużej intensywności przy częstości 1623 cm^{-1} (rys. 10) Zgodnie z obliczeniami na poziomie DFT odpowiada ona linii o częstości 1619 cm^{-1} i intensywności A^{IR} równej 269 km/mol (Tabela 7, drganie normalne numer 7).

[§] Przeciętna częstość wynosi około 1050 cm^{-1} dla większości monohalogenopochodnych aniliny.

związków intensywność drgania rock NH_2 jest znikoma zarówno w widmie w podczerwieni, jak i w widmie Ramana. Przykładowo dla kationu rodnikowe aniliny intensywności IR i Ramana maleją niemalże do zera (tabela 5, drganie normalne numer 19), co sprawia iż w tym przypadku drganie wahadłowe nie jest obserwowane w widmie doświadczalnym. Jednocześnie dla A^+ wcześniejsze przypisanie drgania wahadłowego linii widma w podczerwieni przy częstotliwości 1107 cm^{-1} , zarejestrowanej przez Piersta i współpracowników [59], należy uznać za błędne. Natomiast w przypadku PFA obserwowana jest w widmie IR wyjątkowo duża intensywność drgania wahadłowego grupy NH_2 co umożliwia przypisanie drgania linii widma o częstotliwości 1172 cm^{-1} . Wyniki pomiarów bardzo dobrze korelują zarówno z częstotścią rock NH_2 wyznaczoną teoretycznie ($\omega_h = 1169\text{ cm}^{-1}$), jak i z dużą intensywnością drgania w widmie w podczerwieni ($A^{\text{IR}} = 93,1\text{ km/mol}$).

Częstość przypisana drganiu torsyjnemu grupy NH_2 dla badanych cząsteczek została wyznaczona w zakresie od 277 cm^{-1} (A) do 555 cm^{-1} (A^+). Jak pokazano na przykładzie halogenoanilin [7], im bardziej spłaszczona jest grupa $-\text{NH}_2$ tym wyższa jest częstość drgania τ_{NH_2} . Tłumaczy to dwukrotny wzrost częstości przypisanej drganiu torsyjnemu dla płaskiego kationu rodnikowego aniliny w stosunku do neutralnej aniliny o piramidalnej geometrii grupy aminowej (przesunięcie *blue-shift* o 278 cm^{-1}). Jednocześnie, dla płaskiej struktury obserwujemy dramatyczny spadek intensywności drgania torsyjnego τ_{NH_2} . Przykładowo dla 4FA intensywność drgania skręcającego grupy NH_2 (tabela 8, drganie numer 34) wynosi $A^{\text{IR}} = 18\text{ km/mol}$, a pasmo przypisane drganiu τ_{NH_2} obserwowane jest w widmie IR (faza gazowa) przy częstotliwości 245 cm^{-1} [40]. Równocześnie dla płaskiego rodnika kationowego aniliny intensywność przypisana drganiu skręcającemu spada do zera – symetria A_2 (tabela 5, drganie numer 35). Wskazuje to, iż poprzednie przypisanie drgania torsyjnego linii przy częstotliwości 356 cm^{-1} dla rodnika kationowego aniliny, przedstawiane przez innych autorów [59, 71], było błędne.

Drganie wachlarzowe* grupy $-\text{NH}_2$ w anilinie ma silnie anharmoniczny charakter, co uniemożliwia jego poprawne opisanie poprzez przybliżenie harmoniczne. Jak pokazano w [69, 70], drganie to jest opisywane przez symetryczny potencjał o podwójnym minimum, z barierą inwersji przy częstotliwości 526 cm^{-1} . Linie absorpcyjne obserwowane w widmie IR aniliny w fazie gazowej przy częstotliwościach $40,8$ oraz $423,8\text{ cm}^{-1}$ zostały przypisane tonowi podstawowemu oraz pierwszemu nadtonowi [39, 69]. Podane częstotliwości

* Drgania wachlarzowe (ang. *wagging*) grupy aminowej określane jest także jako inwersja grupy $-\text{NH}_2$.

eksperymentalne bardzo dobrze odpowiadają obliczeniom *ab initio* inwersji grupy aminowej w anilinie w przybliżeniu anharmonicznym [72]. Obliczenia wykonane na poziomie B3LYP w bazie 6-311++G(df,pd) w oparciu o przybliżenie anharmoniczne przypisują drganiu wachlarzowemu grupy aminowej w cząsteczce aniliny częstość $\omega_{\text{anh}} = 477,1 \text{ cm}^{-1}$ (dane niepublikowane)*.

W przypadku innych pochodnych aniliny o piramidalnej geometrii grupy aminowej wyznaczenie częstości drgania wachlarzowego grupy $-\text{NH}_2$ jest mocno problematyczne. Przykładowo dla 4FA drganie jest opisywane przez symetryczną, jedno wymiarową funkcję potencjału o podwójnym minimum o barierze inwersji równej 600 cm^{-1} [75]. W tej sytuacji przybliżenie harmoniczne nie jest w stanie oddać częstości i intensywności drgania torsyjnego grupy aminowej. Niestety, algorytm przybliżenia anharmonicznego zaimplementowany w pakiecie GAUSSIAN 09 również błędnie opisuje omawiane drganie. Przykładowo dla 2FA częstość drgania wachlarzowego wyznaczonego w przybliżeniu harmonicznym wynosi $\omega_{\text{h}} = 513 \text{ cm}^{-1}$ (wartość nieskalowana), a w przybliżeniu anharmonicznym $\omega_{\text{anh}} = 324 \text{ cm}^{-1}$, podczas gdy częstość zmierzona eksperymentalnie wynosi tylko $49,7 \text{ cm}^{-1}$ (Tabela 6, drganie numer 36). Ponadto w literaturze, drganie nożycowe grupy NH_2 często jest błędnie przypisywane zakresowi częstości od 434 cm^{-1} dla dichloroaniliny [76] do 717 cm^{-1} dla 1,4-diaminobenzenu [77]. Jak pokazali Kydd i Kruger wyznaczając widmo w podczerwieni halogenopochodnych aniliny w fazie gazowej [40], pasma z zakresu od 300 do 700 cm^{-1} są nadtonami związanymi z inwersją grupy NH_2 (przejścia $1 \rightarrow 2$ i $1 \rightarrow 3$). Przykładowo dla mono fluoroanilin, pasma w widmie w podczerwieni rejestrowane przy częstościach 640 cm^{-1} dla 2FA; 665 cm^{-1} dla 3FA oraz 648 cm^{-1} dla 4FA związane są przejściem $1 \rightarrow 3$ określonym dla inwersji grupy aminowej [40]. Warto także podkreślić, iż jak pokazują obliczenia, także intensywność drgania nożycowego grupy aminowej w widmie IR są przeszacowane, a wyznaczenie intensywności Ramana też jest problematyczne. Przykładowo przeliczając aktywności ramanowskie (*Raman scattering activities*) dla PFA ($3.0 \text{ \AA}^4/\text{amu}$) na intensywności ramanowskie zgodnie ze wzorami 1 i 2 oraz przyjmując częstość drgania wyznaczoną o przybliżenie harmoniczne $\nu_{\text{inv}} = 461,7 \text{ cm}^{-1}$ uzyskujemy intensywność w widmie teoretycznym Ramana równą $I_{\text{harm}}^{\text{R}} = 11,9$. Natomiast dla częstości drgania

* Niu wraz ze współpracownikami [73] oraz Rauhut i Pullay [74] obliczyli częstość grania wahadłowego grupy aminowej w oparciu o średnią dwóch przejść $1 \rightarrow 3$ oraz $0 \rightarrow 2$ wyznaczonych w przybliżeniu harmonicznym na 541 cm^{-1} . Co ciekawe dokładnie taka sama wartość została uzyskana w prezentowanych w pracy obliczeniach (tabela 4, drganie numer 30).

wachlarzowego wyznaczonej w oparciu o przybliżenie anharmoniczne $\nu_{\text{inv}} = 207,0 \text{ cm}^{-1}$ obliczona intensywność wynosi $I_{\text{anh}}^{\text{R}} = 40,1$, a więc jest ponad trzykrotnie wyższa [35].

Odmienne dla płaskiej cząsteczki przybliżenie harmoniczne dobrze odzwierciedla dane eksperymentalne zgodnie z tabelą 5, drganie numer 30. Piest ze współpracownikami [59] przypisali drganie wachlarzowego grupy aminowej w A^+ częstości 652 cm^{-1} . Także inni autorzy przyporządkowali drganie wachlarzowe podobnemu zakresowi częstości od 656 do 658 cm^{-1} [58, 63, 71]. Nasze obliczenia potwierdzają przypisanie innych autorów* i potwierdzają, że w przypadku rodnika kationowego aniliny częstość drgania wachlarzowego $-\text{NH}_2$ (B_1) jest dużo wyższa z uwagi na planarność cząsteczki [34]. Co więcej obliczenia dla grupy nitrowej, także potwierdzają skuteczność przybliżenia harmonicznego do opisu drgania wachlarzowego w przypadku płaskiej cząsteczki [22, 23].

1.5.3.3 Drganie C-N

Zgodnie z tabelą 1 wyznaczona teoretycznie częstość drgania rozciągającego $\nu(\text{C-N})$ dla cząsteczki aniliny wynosi 1280 cm^{-1} (51% udziału $\nu(\text{C-N})$ w drganiu numer 15). Przeprowadzone obliczenia znakomicie odzwierciedlają wyniki eksperymentu, zgodnie z którymi drganie rozciągające $\nu(\text{C-N})$ obserwowane jest w widmie IR jako pasmo o maksimum intensywności zarejestrowanym przy częstości 1282 cm^{-1} (pomiar w matrycy argonowej [58]).

W przypadku rodnika kationowego aniliny częstość przypisana drganiu rozciągającemu $\nu(\text{C-N})$ rośnie do 1375 cm^{-1} przy jednoczesnym dramatycznym spadku intensywności drgania w widmie w podczerwieni (rysunek 7, drganie numer 15). Z drugiej strony intensywność tego drgania w widmie Ramana jest blisko trzykrotnie wyższa dla rodnika kationowego aniliny, niż dla cząsteczki aniliny (rysunek 8). Pozwoliło to przyporządkować pasmo o częstości 1385 cm^{-1} obserwowane przez Songa i współpracowników [63] drganiu numer 15 dla A^+ (tabela 5)[†].

Zgodnie z tabelą 4, drganie numer 25 także zawiera znaczący wkład drgania $\nu(\text{C-N})$ (23% PED). Na podstawie pomiarów IR cząsteczki aniliny w matrycy argonowej, drganie to zostało przyporządkowanie linii o częstości 822 cm^{-1} [63], co pozostaje w znakomitej zgodności z prezentowanymi w pracy wynikami obliczeń teoretycznych

* Należy podkreślić, że obliczenia na poziomie UMP2/6-31G* dla rodnika kationowego zdecydowanie zaniżają częstość drgania wahadłowego grupy aminowej (532 cm^{-1}) [63].

[†] Obliczenia metodą UMP2 w bazie 6-31G* zawyżają częstości o około 70 cm^{-1} w odniesieniu do eksperymentu [63].

(819 cm^{-1}). Jednocześnie wcześniejsze przypisania linii 812 cm^{-1} (1) raportowane przez Evansa [64] oraz linii 822 cm^{-1} (10a) przypisane przez Castellá-Venture i Kassaba [65] należy uznać za niewłaściwe.

W przypadku para halogeno pochodnych aniliny obserwujemy dominujący* wkład drgania rozciągającego $\nu(\text{C-N})$ w drganiu numer 14 (Tabele 8, 9 i 10). Warto podkreślić, że dla wszystkich omawianych związków otrzymano bardzo dobrą zgodność wyników obliczeń z częstościami wyznaczonymi eksperymentalnie. Przykładowo dla 4FA drganie $\nu(\text{C-N})$ obserwowane jest w widmie IR przy częstości 1273 cm^{-1} i w widmie ramanowskim przy częstości 1275 cm^{-1} (Tabela 8, drganie 14). Wyznaczone w przybliżeniu anharmonicznym i harmonicznym częstości omawianego drgania wynoszą odpowiednio 1275 i 1279 cm^{-1} . Dla 2FA, 3FA oraz PFA ruch drgający $\nu(\text{C-N})$ towarzyszy drganiom rozciągającym C-C pierścienia aromatycznego oraz drganiom zginającym $\beta(\text{CH})^\dagger$ dla 2FA i 3FA lub rozciągającym $\nu(\text{CF})$ dla PFA[‡]. Zmiana charakteru drgań towarzyszących ruchowi rozciągającemu C-N w PFA związana jest z brakiem obecności lekkich atomów wodoru przyłączonych do pierścienia aromatycznego.

Dla rodnika kationowego aniliny w widmie IR pojawia się nowa linia obserwowana przy częstości 1483 cm^{-1} [58, 59]. Pasma to związane jest z drganiem rozciągającym C-N (23% PED) oraz drganiem zginającym w płaszczyźnie C-H (tabela 5, drganie numer 11). Częstość teoretyczna przyporządkowana temu drganiu, 1491 cm^{-1} , jest bardzo blisko wartości wyznaczonej eksperymentalnie. Także duża intensywność drgania w widmie Ramana jest zgodna z wynikami obliczeń tak jak pokazano na rysunku 8 (drganie 11).

Zgodnie z wynikami obliczeń, częstość drgania zginającego w płaszczyźnie $\beta(\text{C-N})$ dla cząsteczki aniliny wyznaczono na 377 cm^{-1} , co odpowiada wartości eksperymentalnej 390 cm^{-1} (tabela 4, drganie numer 34). Podobną częstość dla drgania zginającego w płaszczyźnie $\beta(\text{C-N})$ wyznaczono dla cząsteczki rodnika kationowego aniliny, 383 cm^{-1} (tabela 5, drganie numer 34), co pozostaje w bardzo dobrej zgodności z wynikami pomiarów Piesta i współpracowników [59] i skutkuje koniecznością weryfikacji wcześniejszego przypisania tego drgania linii widma przy częstości 550 cm^{-1} [63]. Dla pozostałych omawianych w pracy pochodnych aniliny, najniższą częstości przypisaną

* PED > 50%.

† W widmie IR obserwowane są pasma o średniej intensywności przy częstościach 1304 cm^{-1} (2FA) oraz 1311 cm^{-1} (3FA) o udziale około 20-25% drgania rozciągającego $\nu(\text{CN})$ (Tabele 6 i 7, drganie numer 13).

‡ Dla PFA drganie rozciągające $\nu(\text{C-N})$ przypisano drganiom numer 7 (12% PED), 8 (17% PED), 12 (28% PED) oraz 14 (15% PED) zgodnie z tabelą 11.

drzaniu $\beta(\text{C-N})$, równą 282 cm^{-1} (PFA, drzanie numer 30*, tabela 11) obserwujemy dla PFA co związane jest z najkrótszą dłuęością wiązania C-N ($1,379\text{ \AA}$) spośród halogenoanilin.

Drganie poza płaszczyznowe $\gamma(\text{CN})$ związane jest z drzaniem torsyjnym pierścienia i wnosi znaczący udział w cząsteczce aniliny w drzania numer 27, 32 i 36, odpowiednio dla wyznaczonych częstotliwości 752 , 489 i 217 cm^{-1} (Tabela 4). Prezentowane częstotliwości teoretyczne są bliskie wartościom eksperymentalnym, wynoszącym odpowiednio 755 [58], 501 i 217 cm^{-1} [64]. Jeszcze lepszą zgodność uzyskano w przypadku obliczeń dla rodnika kationowego aniliny, gdzie częstotliwości wyznaczone teoretycznie dla drzania $\gamma(\text{CN})$: 785 , 444 i 181 cm^{-1} , bardzo dobrze korelują z wartościami doświadczalnymi, wynoszącymi odpowiednio: 785 , 442 [59] i 179 cm^{-1} [63][†] (Tabela 5). Dla halogenopochodnych aniliny drzanie poza płaszczyznowe $\gamma(\text{CN})$ związane jest dodatkowo z drzaniem poza płaszczyznowymi węgiel – atom halogenu. Przykładowo PFA drzanie numer 33 (tabela 11) można utożsamić z poza płaszczyznowym drzaniem numer 11 wg numeracji Wilsona dla cząsteczki benzenu. W drzaniu tym atomy przyłączone do pierścienia aromatycznego schodzą jednocześnie „nad” i „pod” płaszczyznę pierścienia.

1.5.3.4 Drgania pierścienia benzenowego

Analiza rozkładu energii potencjalnej pozwoliła na prawidłowe przypisanie drzania związanego z naprzemiennym ruchem atomów węgla „nad” i „pod” płaszczyznę pierścienia, określanego jako „*ring puckering mode*” (drzanie numer 28, tabela 4)[‡]. Wyznaczona teoretycznie częstotliwość drzania τ_{ring} wynosi 689 cm^{-1} i pozostaje w idealnej zgodności z danymi doświadczalnymi, 688 cm^{-1} [58]. Dla rodnika kationowego aniliny, wyznaczona częstotliwość tego drzania, 626 cm^{-1} , także pozostaje w dobrej zgodności z danymi eksperymentalnymi, 622 cm^{-1} [59]. Należy podkreślić, iż wcześniejsze przypisania tego drzania były nieprawidłowe. Takahashi ze współpracownikami [66] przypisali linię o częstotliwości 628 cm^{-1} pierwszemu nadtonowi drzania wachlarzowego grupy aminowej. Natomiast Song ze współpracownikami [63] przypisali linie, 445 i 629 cm^{-1} , drzaniom 4 i 16b o numeracji zgodnej z notacją Wilsona. Warto także odnotować przesunięcie

* Drganie numer 30 dla PFA (tabela 11) można utożsamić z drzaniem numer 15 wg numeracji Wilsona dla cząsteczki benzenu.

[†] Wcześniejsze przypisanie przez Songa [63] draniu $\gamma(\text{CN})$ linii o częstotliwości 577 cm^{-1} w widmie A+ należy uznać za błędne.

[‡] W literaturze polskojęzycznej drzanie to opisywane jest jako „*falowanie pierścienia*”.

o ponad 600 cm^{-1} w kierunku niższych częstotliwości drgania $\tau_{1\text{ring}}$ dla PFA (drżanie numer 34, tabela 11). Tak duże przesunięcie związane jest z zastąpieniem wszystkich „lekkich” atomów wodoru przyłączonymi do pierścienia aromatycznego, atomami fluoru w PFA.

Drgania oznaczone numerem 21 w tabeli 4 dla cząsteczki aniliny określane jest jako trygonalne oddychanie pierścienia* i pochodzi od drżania pierścienia benzenowego nr 12 w notacji Wilsona. Natomiast drżanie numer 20 w tabeli 4 związane jest z ruchem rozciągającym C-C połączonym w z ruchem zginającym C-H w płaszczyźnie układu aromatycznego. Drgania te zostały odpowiednio przyporządkowana liniom o częstotliwościach 996 i 1028 cm^{-1} , dla pomiarów IR aniliny w matrycy argonowej [58]. Obydwa drżania cechuje słaba intensywność w widmie w podczerwieni, w przeciwieństwie do widma Ramana, w którym wykazują dużą intensywność. Dla rodnika kationowego aniliny, drżania numer 20 i 21 zostały przypisane częstotliwościom eksperymentalnym 993 cm^{-1} [59] oraz 982 cm^{-1} [58], co w doskonałym stopniu koreluje z wynikami obliczeń (992 cm^{-1} oraz 979 cm^{-1}). Co ciekawe intensywności drżań numer 20 i 21 są „odwrotne” dla A^+ niż dla A , tak jak pokazano na rysunku 8.

Intrygującym okazała się także wyjątkowo duża intensywność w widmie ramanowskim drżania przypisanemu trygonalnemu oddychaniu pierścienia dla 3FA (Tabela 7, drżanie 20), podczas gdy w przypadku para halogeno pochodnych aniliny intensywność omawianego drżania była znacząco niższa. Jak szczegółowo pokazano w pracy [34], związane jest to z charakterystycznym ruchem atomów dla 3FA. W ruchu atomów pierścienia benzenowego oznaczonego numerem 12 w notacji Wilsona, gdy atomy C_2 , C_4 oraz C_6 zbliżają się do centrum pierścienia, atomy C_1 , C_3 oraz C_5 oddalają się od centrum i na odwrót[†]. Opisany synchroniczny ruch atomów w płaszczyźnie pierścienia aromatycznego skutkuje bardzo silnym pasmem obserwowanym dla 3FA w widmie Ramana przy częstotliwości 1001 cm^{-1} , co znakomicie odzwierciedlają prezentowane w tabeli 7 wyniki obliczeń ($\omega_{\text{anh}} = 1005\text{ cm}^{-1}$). W przypadku 4FA następuje zaburzenie naprzemiannego ruchu atomów w płaszczyźnie, a atom C_1 praktycznie nie wykazuje żadnego wychylenia. W efekcie czego, intensywność w widmie Ramana omawianego drżania maleje praktycznie do zera[‡] (Tabela 8, drżanie numer 19). Natomiast najsilniejsze

* Ang. *trigonal ring breatching vibration*.

[†] Animacja komputerowa związana z trygonalnym oddychaniem pierścienia, pokazuje, iż atomy C_1 , C_3 i C_5 kreślą na płaszczyźnie cząsteczki jeden trójkąt, a atomy C_2 , C_4 i C_6 , drugi trójkąt. Ich nałożenie przypomina gwiazdę Dawida, stąd w języku angielskim drżanie to określane jest także jako „*Star of David*” vibration.

[‡] Podobny efekt zaobserwowano dla drżania numer 19 zaobserwowano dla 4ClA i 4BrA, co potwierdza, iż przyłączenie atomu halogenu w pozycję *para* aniliny, powoduje dramatyczny spadek intensywności omawianego drżania.

pasmo w widmie eksperymentalnym Ramana dla 4FA, związane jest z linią o maksimum zarejestrowanym częstości 853 cm^{-1} , co pokazano na rysunku 13. Odpowiada ono drganiu numer 22 w tabeli, w którym to ruch atomów można opisać jako symetryczne „oddychanie” pierścienia. W widmie Ramana dla aniliny analogiczne pasmo obserwowane jest przy częstości 819 cm^{-1} [21], natomiast dla 4ClA i 4BrA odpowiednio przy częstościach 826 i 823 cm^{-1} . Należy wspomnieć, że wcześniejsze przypisanie tego pasma drganiu wachlarzowemu grupy NH_2 dla 4BrA [61] jest błędne.

W widmie w podczerwieni mono-fluoroanilin przedstawionym na rysunku 10, obserwowane jest pasmo o dużej intensywności przy częstościach: 1505 cm^{-1} dla 2FA, 1495 cm^{-1} dla 3 FA oraz 1509 cm^{-1} dla 4FA. Drganie to jest związane z ruchami zginającymi w płaszczyźnie $\beta(\text{CH})$ połączonymi z drganiami rozciągającymi $\nu(\text{CC})$ (drżanie nr 10 w tabelach 6-8). Interesujące, iż częstość tego drżania jest mało wrażliwa na miejsce podstawienia aniliny atomem fluoru. Także zastąpienie fluoru w 4FA, atomem chloru lub bromu, powoduje tylko nieznaczny efekt *red shift*, od 9 do 20 cm^{-1} . W przypadku 4ClA opisywane pasmo zostało zarejestrowane w widmie IR przy częstości 1500 cm^{-1} [40, 62], natomiast dla 4BrA przy częstości 1489 cm^{-1} [61]. Podobnie jak w przypadku 4FA, pasmo to ma najwyższą intensywność w widmie w podczerwieni, także dla 4ClA i 4BrA (rysunek 10)*. W przypadku PFA zastąpienie wszystkich atomów wodoru cięższymi atomami fluoru powoduje brak charakterystycznych drżań zginających w płaszczyźnie $\beta(\text{CH})$, a odpowiadające im drżania $\beta(\text{CF})$ przypisano zakresowi od 267 cm^{-1} do 363 cm^{-1} .

1.5.3.5 Drgania C-halogen

Zgodnie z obliczeniami dla 2FA oraz 4FA, drżanie rozciągające $\nu(\text{C-F})$ ma dominujący wkład w drżanie numer 15 (tabele 6 i 8). Drganie to zostało przepisane szerokiej[†] linii absorpcyjnej o dużej intensywności, obserwowanej w widmie w podczerwieni przy częstości 1206 cm^{-1} dla 2FA oraz 1223 cm^{-1} dla 4FA (rysunek 10). Wyznaczone częstości anharmoniczne, 1194 cm^{-1} (2FA) oraz 1223 cm^{-1} (4FA) pozostają

* Jak wspomniano w pracy [7], duża intensywność w widmie w podczerwieni związana jest ze znaczną zmianą momentu dipolowego *para* pochodnych aniliny, podczas drżania cząsteczek oznaczonego numerem 10 w tabelach 6-8. W przypadku pozostałych halogeno pochodnych aniliny, zamiana momentu dipolowego dla analogicznych drżań jest znacznie mniejsza, co skutkuje mniejszą intensywnością odpowiednich pasm w widmach IR.

[†] Znaczna szerokość omawianej linii w widmie doświadczalnym może wskazywać na istnienie oddziaływań międzycząsteczkowych w fazie skondensowanej podczas pomiarów.

w doskonałej zgodności w wartościami eksperymentalnymi. Dla 3FA drganie rozciągające $\nu(\text{C}_3\text{-F})$ jest silnie związane z ruchami w płaszczyźnie $\beta(\text{C}_2\text{H})$ oraz $\beta(\text{C}_6\text{H})$ (drganie numer 16, tabela 7). Zarówno wyznaczona teoretycznie częstość dla omawianego drgania (1152 cm^{-1}), jak i jego duża intensywność, w pełni odpowiadają wynikom pomiaru, pokazującego istnienie silnego pasma w widmie IR zarejestrowanego przy częstości 1146 cm^{-1} .

W widmie Ramana dla 2FA (rysunek 11) najintensywniejsze pasmo obserwowane jest przy częstości 764 cm^{-1} . Jak widać z tabeli 6, najwyższa intensywność ramanowska przypisana jest drganiu numer 24 i zarówno częstości wyznaczone w przybliżeniu harmonicznym (762 cm^{-1}), jak i w przybliżeniu anharmonicznym (766 cm^{-1}) pozostają w znakomitej zgodności z eksperymentem. Procentowy udział drgania rozciągającego $\nu(\text{C-F})$ w drganiu numer 24 wynosi 19%, natomiast pozostałe wkłady związane są w dominującym stopniu z ruchem atomów węgla w płaszczyźnie układu aromatycznego. Podobne silne pasmo w widmie Ramana, z nieznacznym udziałem drgania $\nu(\text{C}_3\text{-F})$ (12% PED) obserwowane jest dla 3FA (drganie numer 25, tabela 7), przy częstości 742 cm^{-1} . Dla 4FA drganie to nie jest obserwowane w widmie Ramana, co odzwierciedla wyznaczona teoretycznie zerowa intensywność dla drgania numer 25 (tabela 8).

W przypadku PFA obserwujemy dominujący udział drgań rozciągających $\nu(\text{C-F})$ w zakresie od 943 cm^{-1} (drganie numer 15, tabela 11) do 1309 cm^{-1} (drganie numer 10, tabela 11). Dwa z drgań w powyższym przedziale dają bardzo intensywne pasmo rejestrowane w widmie w podczerwieni (rysunek 14). Pierwsze z nich, zaobserwowane przy częstości 1001 cm^{-1} , związane jest z drganiem rozciągającym $\nu_{\text{C}_4\text{-F}}$ (26% PED)* połączonym z ruchem $\nu_{\text{C}_1\text{-N}}$ (15%), co skutkuje jego dużą intensywnością w widmie IR (drganie numer 14, tabela 11). Natomiast drganie oznaczone numerem 15 w tabeli 11, rozszerza zakres, w którym są raportowane grania rozciągające $\nu(\text{C-F})$ w fluoroanilinach aż do wspomnianej częstości 943 cm^{-1} . Znajduje to pełne odzwierciedlenie w wynikach obliczeń, zgodnie z którymi częstość powyższego drgania wyznaczona w przybliżeniu anharmonicznym wynosi 940 cm^{-1} a w przybliżeniu harmonicznym 945 cm^{-1} . W drganiu tym ruch rozciągający $\text{C}_2\text{-F}_8$ oraz $\text{C}_3\text{-F}_9$ związany jest ze skróceniem wiązań $\text{C}_5\text{-F}_{11}$ oraz $\text{C}_6\text{-F}_{12}$, analogicznie do grania oznaczonego jako 20b w notacji Wilsona, co skutkuje dużą

* W tabeli 11 udziały poszczególnych drgań rozciągających C-F zostały zsumowane do jednej wartości $\nu(\text{CF})$. Omawiane drganie numer 14 w tabeli 11 można opisać bardziej szczegółowo, z podaniem umownego znaku faz dla poszczególnych drgań odpowiadających symetrii A' , jako: $\nu(\text{C}_4\text{-F}) (+26)$; $\nu(\text{C}_1\text{-N}) (-15)$; $\nu(\text{C}_2\text{-F}) (-7)$; $\nu(\text{C}_6\text{-F}) (-7)$; $\nu(\text{C}_3\text{-C}_4) (+5)$; $\nu(\text{C}_4\text{-C}_5) (+5)$; $\beta_{\text{C}_2\text{F}} (+5)$; $\beta_{\text{C}_3\text{F}} (+5)$; $\beta_{\text{C}_5\text{F}} (-5)$; $\beta_{\text{C}_6\text{F}} (-5)$; $\nu(\text{C}_1\text{-C}_2) (-4)$; $\nu(\text{C}_1\text{-C}_6) (-4)$; $\nu(\text{C}_3\text{-F}) (+4)$; $\nu(\text{C}_5\text{-F}) (+4)$.

intensywnością także tego grania w widmie IR. Trzecie dobrze rozpoznawalne w widmie IR pasmo związane z drganiem rozciągającym $\nu(\text{C-F})$ zostało zarejestrowane przy częstotliwości 1123 cm^{-1} . W przeciwieństwie do wcześniej wspomnianych drgań $\nu(\text{C-F})$, drganie numer 12 w tabeli 11, nie zostało zaobserwowane w widmie IR, lecz w widmie Ramana. Związane jest to z ruchem atomów, w którym jednocześnie rozciągane są „przeciwnie” wiązania $\text{C}_4\text{-F}$ (22% PED) oraz $\text{C}_1\text{-N}$ (28% PED). Warto zaznaczyć, że w tabeli 11, poszczególne udziały drgań rozciągających C-F, zostały zsumowane do jednej wartości $\nu(\text{C-F})$. Bardziej szczegółowa analiza PED pokazuje iż ruchy $\nu(\text{C}_2\text{-F})$ oraz $\nu(\text{C}_6\text{-F})$ dominują w drganiach numer 10, 11 i 15; ruchy $\nu(\text{C}_3\text{-F})$ oraz $\nu(\text{C}_5\text{-F})$ mają dominujący wkład w drganiach numer 6, 7 i 13; a drganie rozciągające $\nu(\text{C}_4\text{-F})$ przeważa w drganiach 12 i 14, zgodnie z numeracją drgań podaną w tabeli 11.

Dla 4ClA drganie rozciągające $\nu(\text{C-Cl})$ towarzyszy deformacji pierścienia i ruchom rozciągającym pierścienia aromatyczny. Zgodnie z analizą energii potencjalnej PED, największy udział drgania rozciągającego $\nu(\text{C-Cl})$ obserwowany jest w przy częstotliwości 379 cm^{-1} w widmie Ramana i widmie w podczerwieni (drganie numer 32, tabela 9). Należy podkreślić, iż wcześniejsze przypisania powyższej linii, nadtonowi [40] lub drganiu zginającemu pierścienia [61], były sprzeczne. Linia przy częstotliwości 642 cm^{-1} w widmie w podczerwieni (drganie numer 27, tabela 9) oraz silne pasmo w widmie Ramana o częstotliwości 1090 cm^{-1} (drganie numer 17, tabela 9) także zawierają znaczący wkład drgania rozciągającego $\nu(\text{C-Cl})$. Co zadziwiająco podobne częstotliwości drgań rozciągających $\nu(\text{C-Cl})$ wyznaczono analizując rozkład energii potencjalnej dla cząsteczki *para*-chlorofenolu: 382, 644 oraz 1096 cm^{-1} [78].

W widmie 4BrA istotny wkład drgania rozciągającego $\nu(\text{C-Br})$ obserwowany jest przy częstotliwościach 292, 602 oraz 1075 cm^{-1} (odpowiednio drgania numer 34, 27 i 17 w tabeli 10). Powyższe rezultaty pozostają w dobrej zgodności z obliczeniami dla *para*-bromofenolu, gdzie w widmie w podczerwieni analogiczne drgania zostały zaobserwowane przy częstotliwościach 284, 606 i 1071 cm^{-1} [78]. Podobne „rozbicie” udziałów drgania rozciągającego $\nu(\text{C-Br})$ i przypisanie ich kilku liniom spektralnym raportowałem w pracy poświęconej 5-bromo-2-nitropyrydynie [22]. W widmie FT-Ramana 5-bromo-2-nitropyrydiny linie o częstotliwości 259 cm^{-1} przypisałem drganiu rozciągającemu $\nu(\text{C-Br})$ połączonego z deformacją pierścienia β_2 ring. Charakter wzmiankowanego drgania jest w pełni analogiczny do grania numer 34 dla 4BrA. Podobnie wyraźną analogię, widać w przypadku drgania o dużej intensywności w widmie IR zarejestrowanym przy częstotliwości 1088 cm^{-1} dla 5-bromo-2-nitropyrydiny. Drganie to możemy opisać jako „symetryczne”

rozciąganie wiązań C₃-C₄ oraz C₄-C₅, któremu towarzyszy skracanie wiązania C-Br* . Odzwierciedla to przedstawioną w tabeli 10 notacja dla drgania numer 17 dla 4BrA.

Generalnie drgania zginające w płaszczyźnie β(CF) oraz drgania poza płaszczyznę γ(CF) współuczestniczą odpowiednio z drganiami β(C₁F) oraz γ(C₁F) [34]. Podobną zależność zaobserwowano dla *para*-chloro i *para*-bromo pochodnych aniliny [7]. Na podstawie przeprowadzonej analizy PED można uszeregować częstości przepisane drganiom zginającym w płaszczyźnie węgiel-halogen w następujące kolejności[†]: β(C₄Br) {80%/211 cm⁻¹} < β(C₄Cl) {72%/242 cm⁻¹} < β(C₂F) {34%/299 cm⁻¹} < β(C₄F) {44%/435 cm⁻¹} < β(C₃F) {49%/462 cm⁻¹}. Analogiczne uszeregowanie można utworzyć dla drgań poza płaszczyznę: γ(C₂F) {35%/285 cm⁻¹} < γ(C₄Br) {48%/309 cm⁻¹} < γ(C₄Cl) {50%/311 cm⁻¹} < γ(C₄F) {44%/364 cm⁻¹} < γ(C₃F) {40%/592 cm⁻¹}. W obu uszeregowaniach najwyższa częstość została przypisana 3FA. Związane jest to z charakterystycznymi dla pierścienia benzenowymi drganiami, w których atomy węgla drgają naprzemiennie, co ułatwia sprzężenie pomiędzy drganiami zginającymi C₁-N oraz C₃-F. Należy podkreślić iż wcześniejsze przypisanie pasma o częstości 309 cm⁻¹ dla 4BrA, drganiu wachlarzowemu grupy aminowej było niewłaściwe [40] i zgodnie z tabelą 10, powinno być ono prawidłowo scharakteryzowane jako drganie γ(C₄Br).

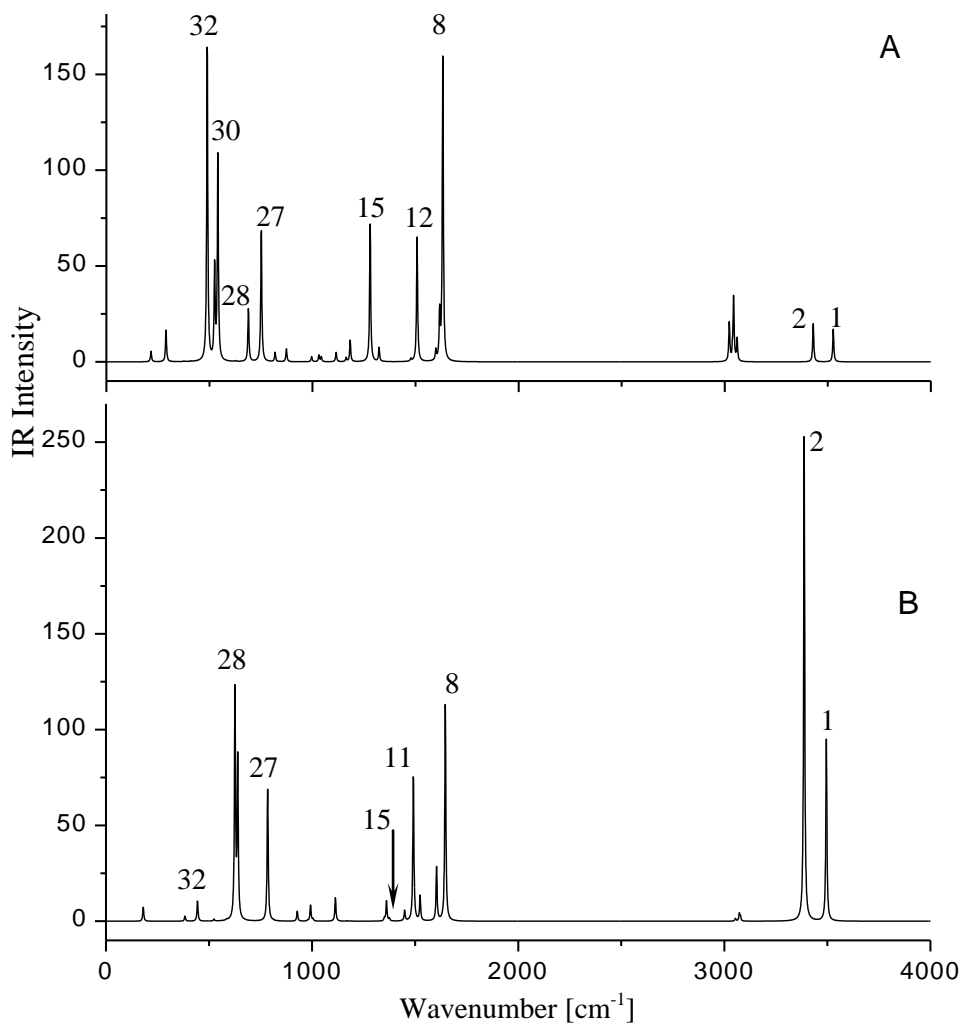
W przypadku PFA, przyporządkowano drganiom zginającym β(CF) pięć drgań numer 28-32 (tabela 11), w zakresie od 267 cm⁻¹ do 321 cm⁻¹. Szczegółowa analiza PED pokazuje, że w przypadku PFA następuje przesunięcie *red-shift* częstości poszczególnych drgań β(CF) w odniesieniu do mono-fluoro pochodnych aniliny.

Przy omawianiu drgań pozapłaszczyznowych, warto wspomnieć, iż skalowane częstości uzyskane w przybliżeniu harmonicznym, na ogół bardzo dobrze korelują z wartościami uzyskanymi w przybliżeniu anharmonicznym. Przykładowo częstości drgań wyznaczonych w przybliżeniu harmonicznym, jak i anharmonicznym dla drgań numer 25, 26 i 33 w tabeli 11, związane z ruchem poza płaszczyznowym atomów fluoru w PFA, odzwierciedlone są w widmie Ramana. Wyjątkiem są drgania poza płaszczyznę γ(CH) numer 18 dla 2FA, numer 19 dla 3FA oraz numer 20 dla 4FA w których wyznaczone częstości dla przybliżenia anharmonicznego są od 80 do 130 cm⁻¹ wyższe, niż wyznaczone w przybliżeniu harmonicznym (Tabele 6-8). Pechowo intensywności tych drgań są bliskie

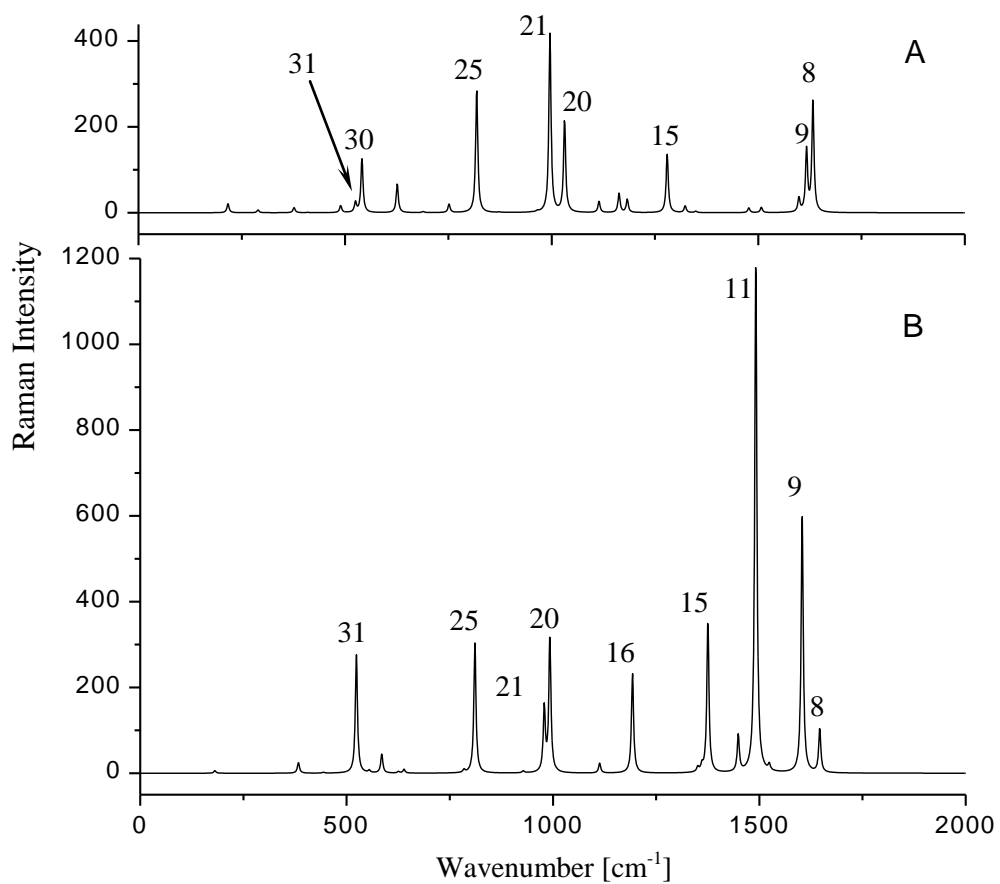
* Opiswane drganie dla 5-bromo-2-nitropyridyny zostało oznaczone jako drganie 'mode Q20', w tabeli 3, w pracy [22].

[†] W nawiasach kłamrowych podano udział procentowy PED, w którym dominujący wkład ma dane drganie β oraz przypisaną mu częstość. Dla danej cząsteczki uwzględniono jedynie drgania o najwyższym udziale procentowym.

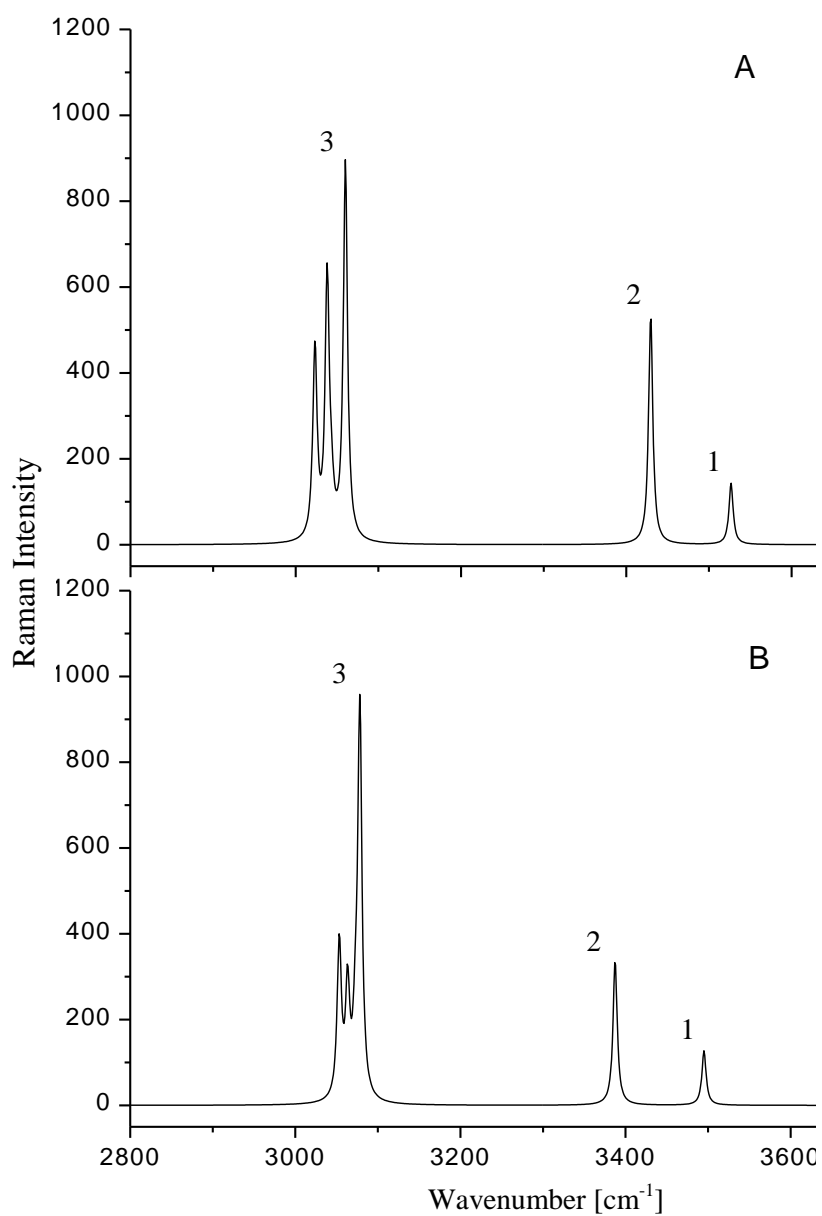
zero, dlatego trudno o weryfikację tych obliczeń z wynikami eksperymentalnymi. W przypadku 4FA w widmie IR obserwowane jest słabe pasmo przy częstotliwości 921 cm^{-1} , które może być przypisane drganiu numer 20 (tabela 8). Częstota harmoniczna wyznaczona dla tego drgania wynosi 910 cm^{-1} , natomiast anharmoniczna 989 cm^{-1} , co sugeruje iż przybliżenie anharmoniczne może zawodzić w przypadku niektórych drgań poza płaszczyznowych $\gamma(\text{CH})$ [34]. Największa rozbieżność pomiędzy przybliżeniem anharmonicznym i harmonicznym dotyczy także drgań poza płaszczyznowych i została odnotowana dla PFA. Drganie numer 20 w tabeli 11 związane jest z naprzemiennym ruchem atomu azotu oraz wszystkich atomów fluoru nad i pod płaszczyznę pierścienia aromatycznego. Częstota dla tego drgania wyznaczona w przybliżeniu anharmonicznym wynosi $1072,9\text{ cm}^{-1}$, natomiast uzyskana w przybliżeniu harmonicznym jest prawie dwukrotnie niższa ($594,3\text{ cm}^{-1}$ wartość nieskalowana i $584,8\text{ cm}^{-1}$ dla współczynnika skalującego 0,983). Niestety także dla drgania $\gamma(\text{CF})$ intensywności, zarówno dla widma IR jak i Ramana są bardzo niskie, co utrudnia w tym przypadku zestawienie prezentowanych wyników obliczeń z danymi doświadczalnymi.



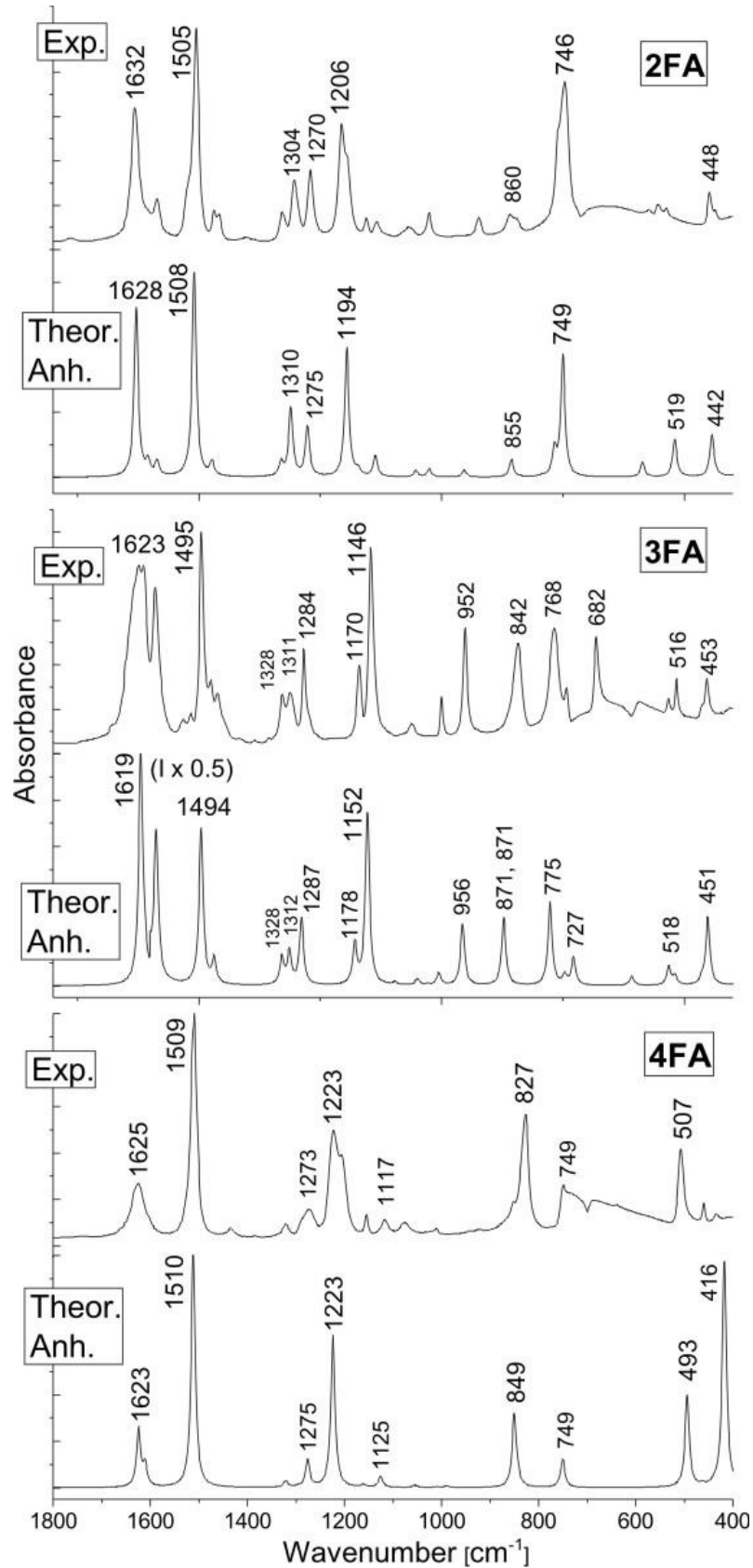
Rysunek 7. Teoretyczne widmo w podczerwieni neutralnej aniliny (A) oraz rodnika kationowego aniliny (A^+). Obliczenia wykonano metodą B3LYP w bazie funkcyjnej 6-311++G(df,pd) [33].



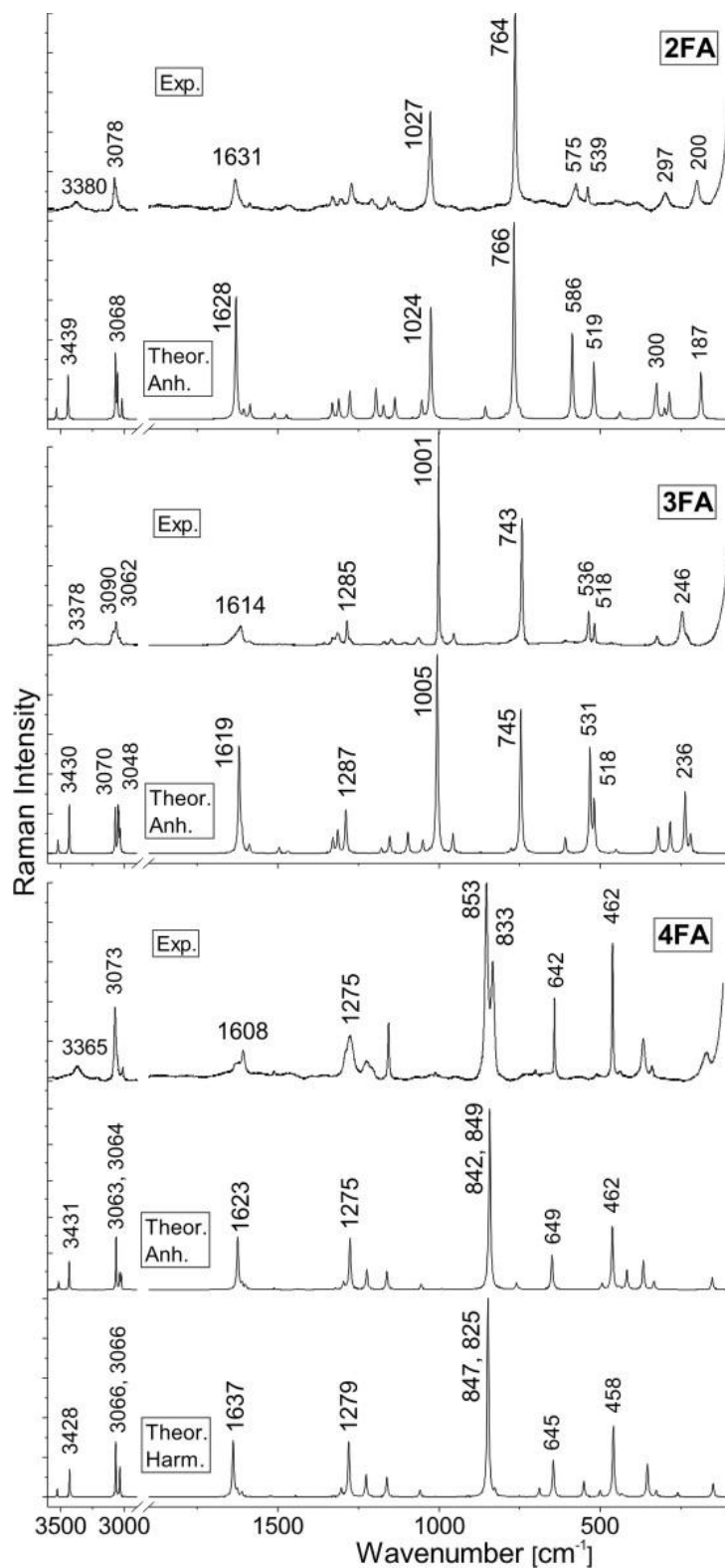
Rysunek 8. Teoretyczne widmo Ramana neutralnej aniliny (A) oraz rodnika kationowego aniliny (A^+) dla zakresu częstotliwości . Obliczenia wykonano metodą B3LYP w bazie funkcyjnej 6-311++G(*df,pd*) [33].



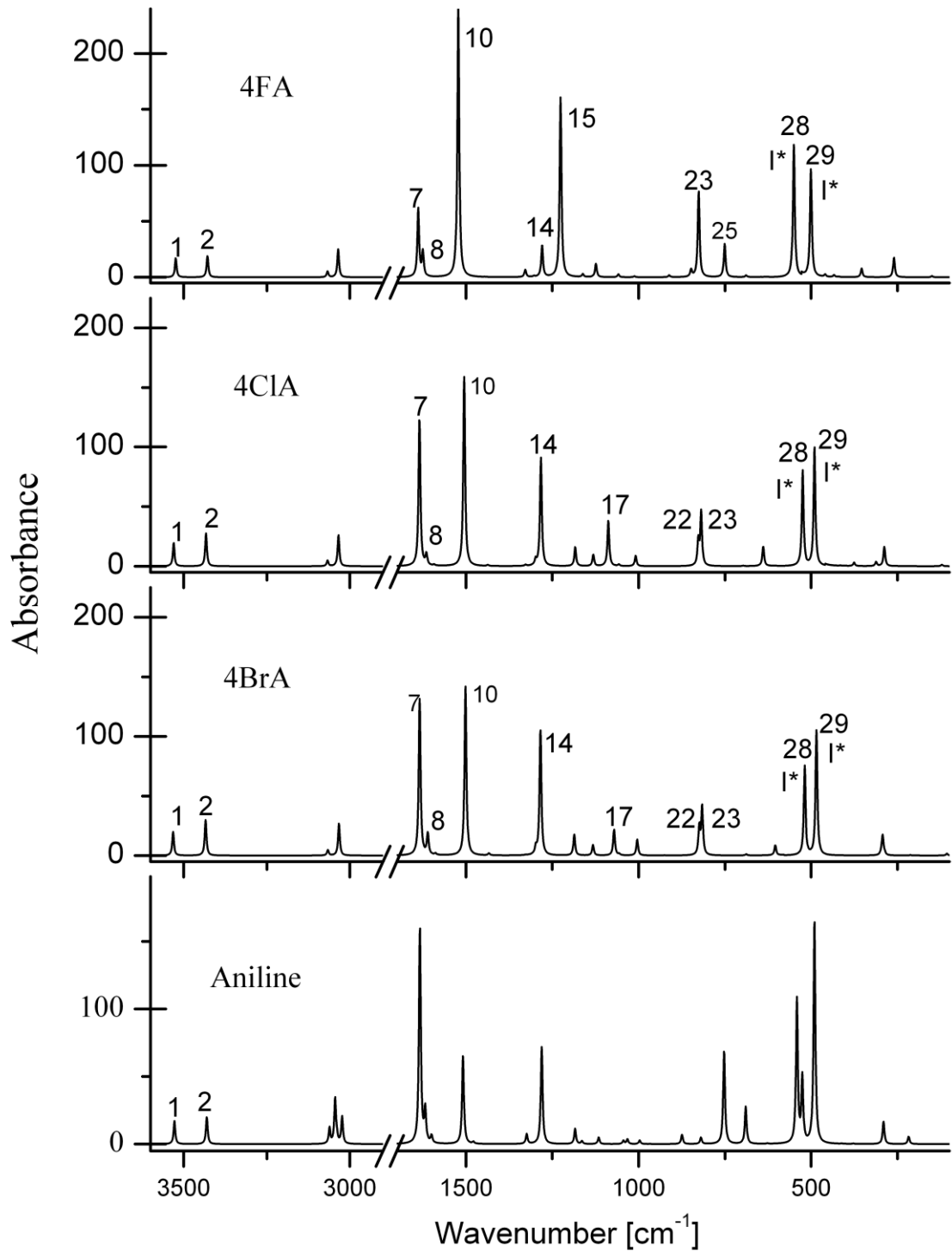
Rysunek 9. Teoretyczne widmo Ramana neutralnej aniliny (A) oraz rodnika kationowego aniliny (A⁺) dla zakresu częstotliwości . Obliczenia wykonano metodą B3LYP w bazie funkcyjnej 6-311++G(df,pd) [33].



Rysunek 10. Zestawienie widm doświadczalnych IR oraz widm wyznaczonych teoretycznie w przybliżeniu anharmonicznym dla 2FA, 3FA oraz 4FA. Obliczenia wykonano metodą B3LYP w bazie funkcyjnej 6-311++G(df,pd) [34].

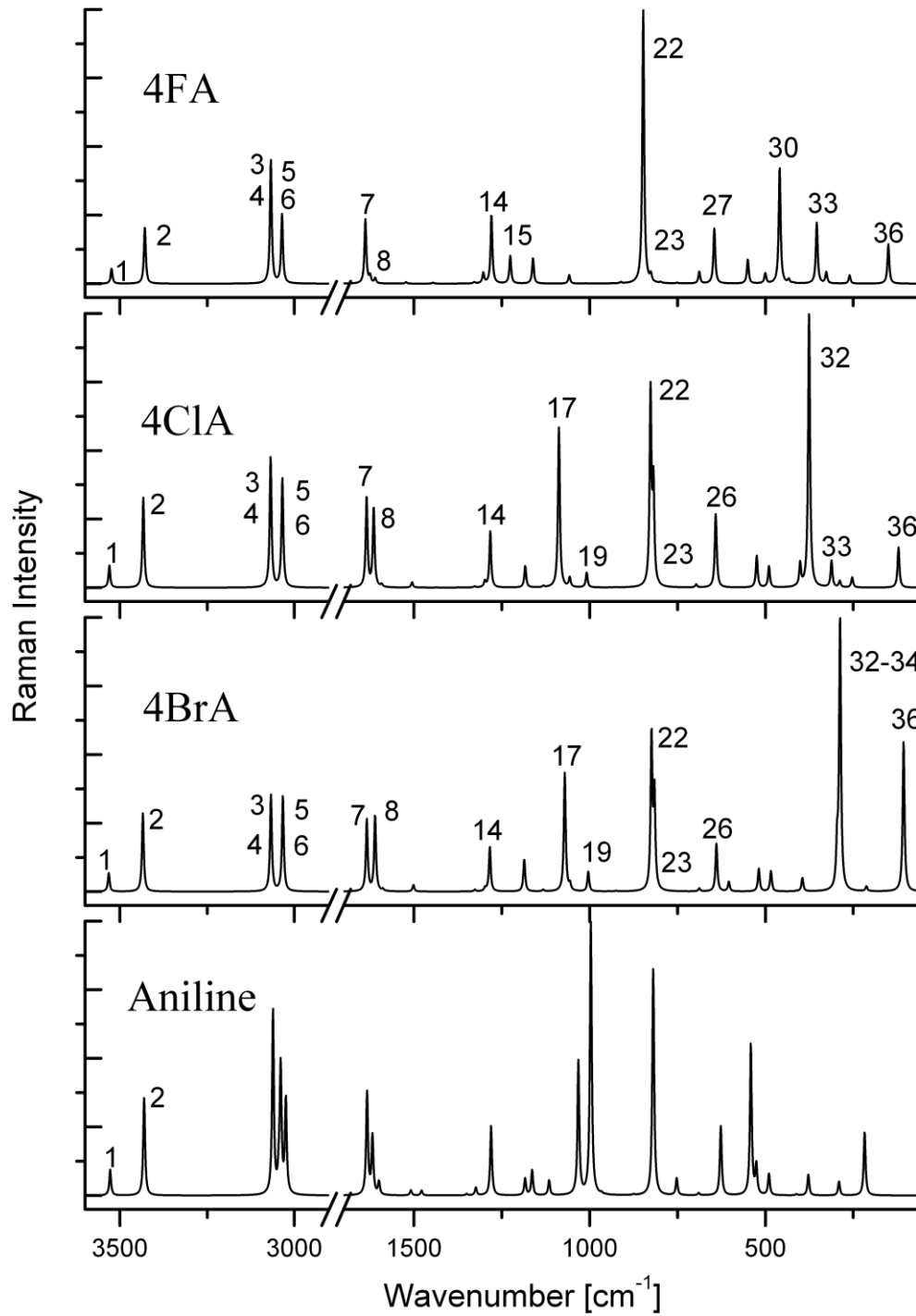


Rysunek 11. Zestawienie widm doświadczalnych Ramana oraz widm wyznaczonych teoretycznie w przybliżeniu anharmonicznym dla 2FA, 3FA oraz 4FA. Obliczenia wykonano metodą B3LYP w bazie funkcyjnej 6-311++G(*df,pd*) [34].



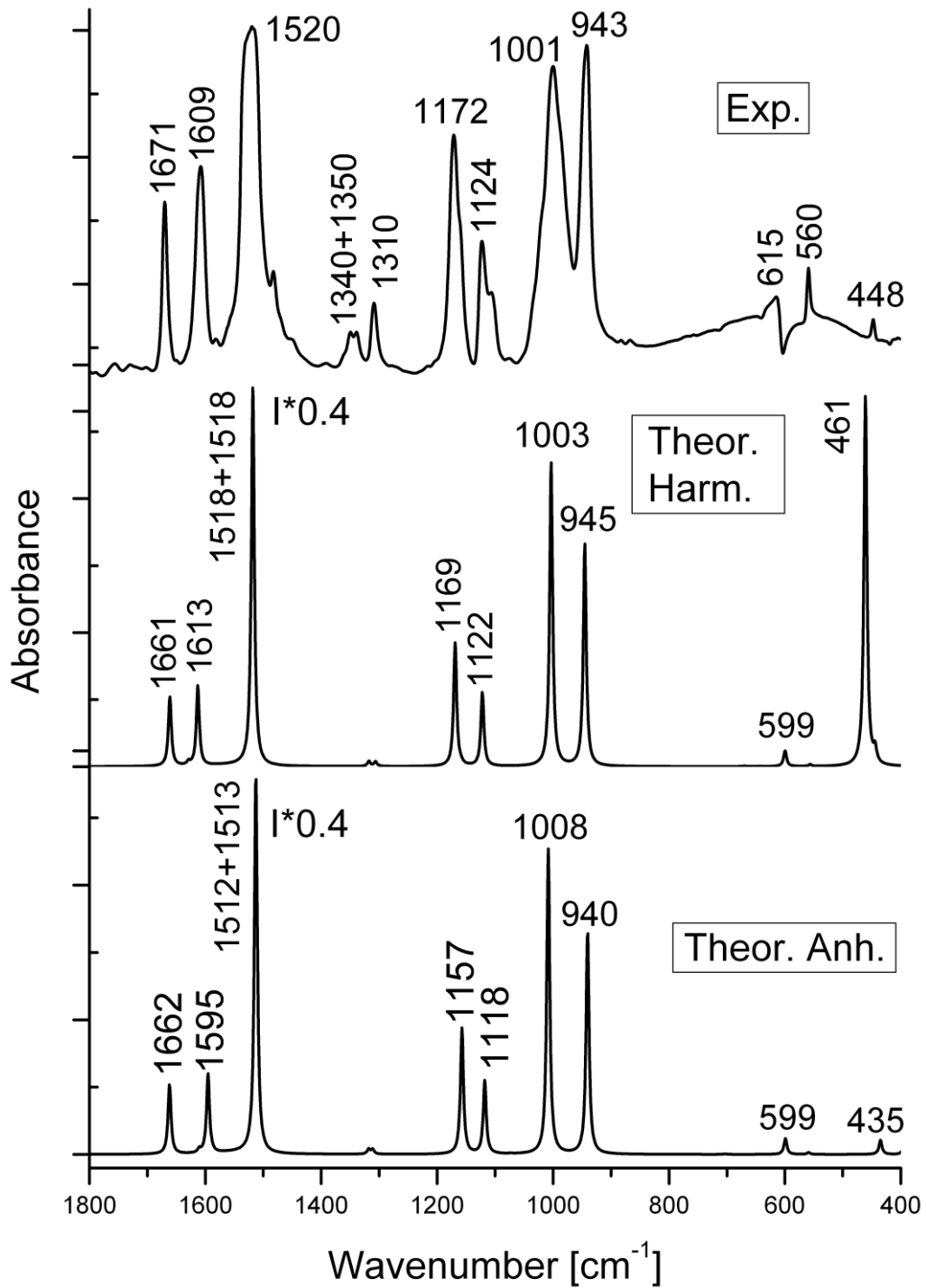
Rysunek 12. Zestawienie widm teoretycznych IR wyznaczonych dla *para*-halogenoanilin^{*}. Intensywność drgania przypisanemu inwersji grupy NH₂ przeskalowano o czynnik 0,5 (oznaczenie na rysunku I*). Na rysunku zaznaczono numery drgań zgodne z tabelami 8-10 oraz publikacją [7].

^{*} Dla porównania na rysunku powtórzono także widmo IR uzyskane dla aniliny (podpisano drgania $\nu_{as}NH_2$ {1} oraz ν_sNH_2 {2}).

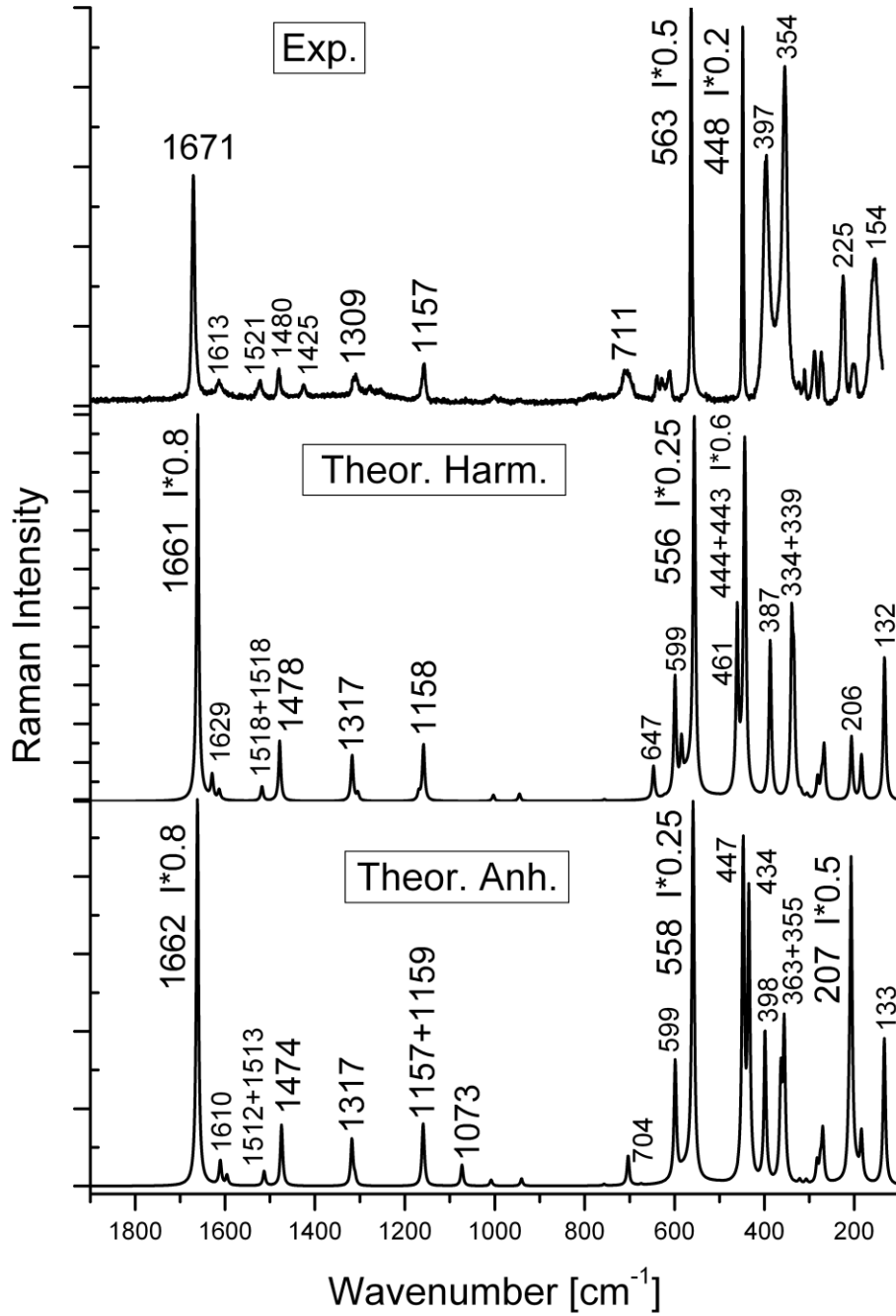


Rysunek 13. Zestawienie widm teoretycznych IR wyznaczonych dla *para*-halogenoanilin*. Obliczenia wykonano dla $\nu_0 = 1064 \text{ nm}$, co odpowiada długości fali lasera Nd:YAG. Na rysunku zaznaczono numery drgań zgodne z tabelami 8-10 oraz publikacją [7].

* Dla porównania na rysunku powtórzono także widmo Raman uzyskane dla aniliny (podpisano drgania $\nu_{\text{as}}\text{NH}_2$ {1} oraz $\nu_{\text{s}}\text{NH}_2$ {2}).



Rysunek 14. Zestawienie widma doświadczalnego IR oraz widm w przybliżeniu harmonicznym i anharmonicznym dla PFA. Ze względu na czytelność widma, intensywności drgań oznaczonych symbolem I^* przeskalowano zgodnie z podanym na rysunku współczynnikiem skalującym [35].



Rysunek 15. Zestawienie widma doświadczalnego Ramana oraz widm w przybliżeniu harmonicznym i anharmonicznym dla PFA. Intensywności drgań oznaczonych na rysunku I^* przeskalowano zgodnie z podanymi na rysunku współczynnikami skalującymi [35].

1.5.3.6 Przypisanie „problematicznych” drgań normalnych w oparciu o metody MP2 i B3LYP

Większość obliczeń kwantowych prezentowanych w pracy wykonano metodą funkcjonału gęstości B3LYP, gdyż jak pokazano dla cząsteczki aniliny [33], perturbacyjna metoda MP2 zawodzi przy opisie części drgań normalnych. W tabeli 13 zestawiono drgania, dla których występują największe różnice pomiędzy częstościami zmierzonymi eksperymentalnie, a częstościami wyznaczonymi na podstawie rachunku zaburzeń Møllera-Plesseta do drugiego rzędu (MP2).

Tabela. 13. Zestawienie wybranych częstości wyznaczonych eksperymentalnie z częstościami wyznaczonymi teoretycznie metodami MP2 i B3LYP (ω , cm^{-1}) oraz intensywnościami w widmie w podczerwieni (A^{IR} , km/mol) dla cząsteczki aniliny.

No. ^a	Sym. (label)	Exp.	MP2 6-311+G(d,p)		MP2 6-311++G(df,pd)		B3LYP 6-311++G(df,pd)	
			ω	A^{IR}	ω	A^{IR}	ω	A^{IR}
28	A' (4)	688	445	12.6	682	98.2	689	27.6
27	A' (11)	755	727	249.5	752	102.5	752	69.2
24	A' (17b)	875	828	8.3	846	14.2	873	6.9
23	A'' (17a)	957	887	0.5	906	2.1	951	0.0
22	A' (5)	968	884	1.1	967	1.0	966	0.1
14	A'' (14)	1324	1433	6.2	1437	6.2	1323	7.2

^aNumeracja zgodna z tabelą 4.

Z porównania częstości doświadczalnych z wyznaczonymi teoretycznie wynika, iż metoda MP2 zawodzi przy określaniu częstości tych drgań. Największe rozbieżności obserwowane są dla drgań normalnych numer 28 oraz 14. Pierwsze z wymienionych drgań normalnych można opisać jako naprzemienny ruch atomów węgla, nad i ponad płaszczyznę układu aromatycznego, analogicznego do drgania nr 4 zgodnie z notacją Wilsona dla drgań pierścienia benzenowego (*ring puckering motion*) [57]. Obliczenia na poziomie MP2/6-311+G(d,p) pokazują dramatycznie niską częstość, o około 240 cm^{-1}

mniejszą od wartości wyznaczonej eksperymentalnie. Rozbudowanie bazy funkcyjnej do 6-311++G(df,pd) znacząco poprawia zgodność obliczonej częstości drgania w odniesieniu do danych doświadczalnych, lecz wyznaczona intensywność teoretyczna tego drgania w widmie IR jest znacznie przeszacowana. Natomiast metoda B3LYP znakomicie oddaje zarówno częstości eksperymentalne, jak i intensywność drgania*, co zostało zaprezentowane w części pracy opisującej drgania pierścienia.

„Problematycznym” drganiem jest drganie normalne numer 14, związane z naprzemiennym rozciąganiem i skracaniem wiązań C-C w pierścieniu aromatycznym. W literaturze drganie to określane jest jako drganie Kekulégo (*Kekulé mode*), gdyż dwie struktury graniczne związane z maksymalnym wychyleniem atomów węgla odpowiadają dwóm dominującym strukturom rezonansowym dla aniliny (rysunek 6). Jak pokazano w tabeli 13, metoda MP2 przeszacowuje częstość tego drgania o około 110 cm^{-1} niezależnie od użytej w obliczeniach bazy funkcyjnej. Natomiast obliczenia wykonane metodą B3LYP wykazują bardzo dobrą zbieżność z danymi doświadczalnymi.

Handy i współ. [79] podobnie deprecjonują metodę MP2 w odniesieniu obliczeń dla cząsteczki benzenu dla drgań normalnych oznaczonych jako 4 i 14 w notacji Wilsona [57]. Podobne rozbieżności zostały także zaobserwowane dla obliczeń na poziomie metody MP2 dla cząsteczki fenolu [21]. Równocześnie metoda B3LYP znacznie lepiej odzwierciedla częstości i intensywności poszczególnych drgań, dlatego wykorzystano ją jako metodę referencyjną do przedstawiania wyników obliczeń opisywanych w niniejszym rozdziale.

* Zgodność z danymi eksperymentalnymi dla metody B3LYP uzyskano zarówno stosując rozbudowaną bazę funkcyjną 6-311++G(df,pd), jak i mniejszą bazę 6-311+G(d,p).

1.6 Polianilina

Dalekosiężnym celem przedstawionych w pracy obliczeń, było zaprojektowanie półprzewodników na bazie polimeru aniliny i jej pochodnych. Polianilina będąca izolatorem, odpowiednio domieszkowana mogłaby być przewodnikiem typu *p* lub typu *n*. W perspektywie, pozwoliłoby to na tworzenie elastycznych układów elektronicznych, w których warstwa nośna (polianilina) i warstwy półprzewodzące (domieszkowana polianilina) wywodziłyby się z tego samego materiału. Koncepcja taka zrodziła się pod wpływem prac Alana G. MacDiarmida i Alana J. Heegera, którzy wspólnie z Hideki Shirakawą podjęli badania nad domieszkowaniem poliacetyleny. Zaobserwowali ono, iż już niewielkie dodatki jodu poprawiają przewodnictwo acetyleny o kilka rzędów wielkości, a dodatkowe orientowanie folii na drodze rozciągania umożliwia uzyskanie przewodnictwa w porównaniu równego przewodnictwu miedzi [80-83]. Ich długoletnie badania związane z odkryciem i charakterystyką polimerów przewodzących zostały uhonorowane przyznaniem im w 2000 roku Nagrody Nobla w dziedzinie chemii [84].

W dwóch pracach magisterskich [5, 6], przeprowadzonych pod opieką dr inż. Piotra Wojciechowskiego, podjęto próbę zaprojektowania za pomocą modelowania molekularnego z zastosowaniem teorii funkcjonałów gęstości (DFT) półprzewodnika organicznego na bazie aniliny*. W pracach wykorzystano informację, iż domieszkowanie poliacetyleny akceptorami takimi jak I₂ prowadzi do utworzenia kationów (dodatnio naładowanych solitonów). Z kolei domieszki donorowe, jak sól, prowadzą do tworzenia anionów (solitonów ujemnych) [85, 86]. Przeprowadzone w latach 2004-2008 badania teoretyczne wykazały możliwość wytworzenia materiałów półprzewodnikowych na bazie polianiliny domieszkowanej odpowiednio jonami srebra [5] oraz jodem [6]†. O poprawności wyboru materiału świadczy mnogość tematów opisujących implementacje polianiliny jako materiału półprzewodnikowego [87-91], a sama trafność koncepcji domieszkowania polianiliny została zweryfikowana w 2012 roku w niezależnej pracy poświęconej przewodzącym nanorurkom, określonym jako silver@polyaniline [92].

* Do określenia właściwości proponowanego w pracy półprzewodnika organicznego przeprowadzono optymalizację geometrii: obliczenia parametrów strukturalnych, energii całkowitej układu i różnicy między ostatnim zajęтым a pierwszym wolnym orbitalem (HOMO – LUMO) dla monomeru, dimeru i tetrameru aniliny oraz jej domieszkowanych pochodnych.

† Przykładowo w trakcie domieszkowania polianiliny jodem na łańcuchu polimerowym powstaje ładunek dodatni – dochodzi do rozerwania jednego wiązania π . Powstały w ten sposób wolny elektron może swobodnie się przemieszczać wzdłuż łańcucha. W efekcie podwójne wiązanie „przesuwa się” wzdłuż łańcucha. Natomiast ładunek dodatni jest stabilny na skutek elektrostatycznego przyciągania jonu jodkowego.

1.7 Bibliografia – rozdział I.

- [1] J. B. Foresman, Æ. Frisch; *Exploring Chemistry With Electronic Structure Methods: A Guide to Using GAUSSIAN*, 2 edition; Gaussian (1996).
- [2] L. Piela; *Idee chemii kwantowej* (wydanie I); Wydawnictwo Naukowe PWN (2005).
- [3] a) A. D. Becke, J. Chem. Phys. 104 (1996) 1040; b) A. D. Becke, J. Chem. Phys. 98 (1993) 5648.
- [4] C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, Phys. Rev. B 37 (1988) 785.
- [5] M. Bajan; Modelowanie struktur molekularnych kompleksów polianiliny z jonami srebra; praca dyplomowa wykonana pod kierunkiem dr inż. P. Wojciechowskiego, Politechnika Wrocławska, Wrocław (2005).
- [6] A. Dudkiewicz; polimery przewodzące – modelowanie molekularnych kompleksów polianiliny z jodem; praca dyplomowa wykonana pod kierunkiem dr inż. P. Wojciechowskiego, Politechnika Wrocławska, Wrocław (2008).
- [7] P. Wojciechowski, D. Michalska; Spectrochim. Acta A, 68 (2007) 948.
- [8] P. Wojciechowski, D. Michalska; Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, 805 (2007) 71.
- [9] Z. Rappoport; *The chemistry of anilines, Part 1*; John Wiley & Sons, Ltd. (2007).
- [10] Focus on Pigments 10 (2002) 3.
- [11] A. Nesrullajev, B. Bilgin-Eran; Materials Chemistry and Physics 93 (2005) 21–25
- [12] (a) M.M. Verghese, K. Ramanathan, S.M. Ashraf, M.N. Kamalasanan, B.D. Malhotra, Chem. Mater. 8 (1996) 822; (b) L. Yang, W. Cao, Chem. Mater. 18 (2006) 297.
- [13] (a) L.T. Sein Jr., Y. Wei, S.A. Jansen, Synth. Met. 143 (2004) 1; (b) B.C. Beard, P. Spellane, Chem. Mater. 9 (1997) 1949; (c) J.-M. Yeh, S.-J. Liou, C.-Y. Lai, P.-C. Wu, T.-Y. Tsai, Chem. Mater. 13 (2001) 1131; (d) C. Combellas, M. Delamar, F. Kanoufi, J. Pinson, F.I. Podvorica, Chem. Mater. 17 (2005) 3968; (e) G. Shustak, A.J. Domb, D. Mandler, Langmuir 22 (2006) 5237; (f) D.A. Makeiff, T. Huber, Synth. Met. 156 (2006) 497; (g) S. Mu, Synth. Met. 156 (2006) 202.
- [14] P.L. Franzen, L. De Boni, D.S. Santos Jr., C.R. Mendonca, S.C. Zilio, J. Phys. Chem. B 108 (2004) 19180.
- [15] Z. Liu, J. Zhou, H. Xue, L. Shen, H. Zang, W. Chen, Synth. Met. 156 (2006) 721.
- [16] R. P. Singh, A. Tiwari, A. C. Pandey, J. Inorg. Organomet. Polym. 21 (2011) 788.

- [17](a) J. Whysner, L. Vera, G.M.Williams, *Pharmacological Theory* 71 (1996) 107.
(b) Webster's New World™ Medical Dictionary, 3rd Edition, Wiley Publishing, Inc. (2008).
- [18]R. Krishnan, J.S. Binkley, R. Seeger, J.A. Pople, *J. Chem. Phys.* 72 (1980) 650.
- [19]M.J. Frish, A.J. Pople, J.S. Binkley, *J. Chem. Phys.* 80 (1984) 3265.
- [20]GAUSSIAN 09, Revision B.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2010.
- [21]D. Michalska, W. Zierkiewicz, D.C. Bieńko, W. Wojciechowski, T. Zeegers-Huyskens, *J. Phys. Chem. A* 105 (2001) 8734.
- [22]N. Sundaraganesan, S. Ilakiamani, H. Saleem, P. Wojciechowski, D. Michalska, *Spectrochim. Acta Part A* 61 (2005) 2995–3001.
- [23]N. Sundaraganesan, S. Ilakiamani, H. Saleem, P. Wojciechowski, D. Michalska, *Spectrochim. Acta Part A* 62 (2005) 753.
- [24]V. Barone, *J. Chem. Phys.* 120 (2004) 3059.
- [25]V. Barone, *J. Chem. Phys.* 122 (2005) 014108.
- [26](a) L. Lapinski, M.J. Nowak, Program BALGA for PED calculations;
(b) H. Rostkowska, L. Lapinski, M.J. Nowak, *Vib. Spectrosc.* 49 (2009) 43.
- [27]D.C. Bieńko, D. Michalska, S. Roszak, Wojciechowski, M.J. Nowak, L. Lapinski, *J. Phys. Chem. A* 101 (1997) 7834.
- [28]Chemcraft - *graphical program for working with quantum chemistry computations*;
<http://www.chemcraftprog.com>
- [29](a) J. P. Foster and F. Weinhold, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 7211-7218;
(b) A. E. Reed and F. Weinhold, *J. Chem. Phys.* 78 (1983) 4066-4073; (c) A. E. Reed,

- R. B. Weinstock, and F. Weinhold, *J. Chem. Phys.* 83 (1985) 735-746;
(d) F. Weinhold and C. R. Landis, *Chem. Ed.: Res. & Pract. (CERP; special “Structural Concepts” issue)* 2 (2001) 91-104; (e) F. Weinhold and C. R. Landis, *Valency and Bonding: A Natural Bond Orbital Donor-Acceptor Perspective*, Cambridge University Press (2005).
- [30] NBO 5.0; E. D. Glendening, J. K. Badenhoop, A. E. Reed, J. E. Carpenter, A. Bohmann, C. M. Morales, and F. Weinhold, Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison (2001), <http://www.chem.wisc.edu/~nbo5>
- [31] G. Keresztury, S. Holly, G. Besenyi, J. Varga, A.Y. Wang, J.R. Durig; *Spectrochim. Acta*, 49A (1993) 2007-2026.
- [32] D. Michalska, R. Wysokiński, *Chem. Phys. Lett.* 403 (2005) 211.
- [33] P. Wojciechowski, W. Zierkiewicz, D. Michalska; ; *Journal of Chemical Physics*, 118, 24 (2003) 10900-10911.
- [34] P. Wojciechowski, K. Helios, D. Michalska, *Vibr. Spectr.*, 57 (2011) 126-134.
- [35] P. Wojciechowski, *J. Fluorine Chem.* 154 (2013) 7.
- [36] (a) J. Kruszewski, T.M. Krygowski, *Tetrahedron Lett.* 13, 36 (1972) 3839;
(b) T.M. Krygowski, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 33, 1 (1993) 70; (c) Krygowski, T.M.; Cyrański, M.K. *Tetrahedron*, 52 (1996) 10255; (d) T.M. Krygowski, M. Cyrański, A. Ciesielski, Bożena Świrska, P. Leszczyński, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 36 (1996) 1135; (d) M.K. Cyrański, T.M. Krygowski, *Tetrahedron* 55, 19 (1999) 6205.
- [37] D. G. Lister, J. K. Tyler, J. H. Hög, and N. W. Larsen, *J. Mol. Struct.* 23 (1974) 253.
- [38] M. Quack, M. Stockburger, *J. Mol. Spectrosc.* 43 (1972) 87.
- [39] N. W. Larsen, E. L. Hansen, F. M. Nicolaisen, *Chem. Phys. Lett.* 43 (1976) 584.
- [40] R.A. Kydd, P.J. Krueger, *J. Chem. Phys.* 69 (1978) 827.
- [41] T. Nakanaga, F. Ito, J. Miyawaki, K. Sugawara, and H. Takeo, *Chem. Phys. Lett.* 261 (1996) 414.
- [42] K. B. Wiberg, *Tetrahedron* 24 (1968) 1083.
- [43] V. Mukherjee, K. Singh, N.P. Singh, R.A. Yadav, *Spectrochim. Acta Part A* 73 (2009) 44–53.
- [44] E. Arunan, G.R. Desiraju, R.A. Klein, J. Sadlej, S. Scheiner, I. Alkorta, D. C. Clary, R.H. Crabtree, J.J. Dannenberg, P. Hobza, H.G. Kjaergaard, A.C. Legon, B. Mennucci, D.J. Nesbitt, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 83, No. 8 (2011) 1637–1641.

- [45](a) R.F.W. Bader, T.T. Nguyen-Dang, Y. Tal, *Reports on Progress in Physics*, 44 (1981) 893; (b) R.F.W. Bader, H. Essen, *Journal of Chemical Physics*, 80 (1984) 1943.
- [46] R.S. Mulliken, *The Journal of Chemical Physics*, 23, 10 (1955) 1833.
- [47] J. P. Foster and F. Weinhold, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 7211.
- [48] P. O. Löwdin, *Phys. Rev.* 97 (1955) 1471.
- [49] J. E. Carpenter, F. Weinhold, *J. Mol. Struct. (Theochem)* 169 (1988) 41.
- [50] F. Weinhold, C.R. Landis, *Valency and Bonding: A Natural Bond Orbital Donor-Acceptor Perspective*, Cambridge University Press (2005).
- [51] V. Magnasco, *Models for Bonding in Chemistry*, John Willey & Sons, Ltd (2010).
- [52] P. Wojciechowski; *Wiadomości Chemiczne*, 59, 3-4 (2005) 193-212.
- [53] P. Wojciechowski, portal Siła Wiedzy, 30 maja 2011
- [54] T. Nakanaga, F. Ito, J. Miyawaki, K. Sugawara, and H. Takeo, *Chem. Phys. Lett.* 261, (1996) 414.
- [55] UPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook.
- [56] a) E. D. Glendening and F. Weinhold, *J. Comp. Chem.* 19 (1998) 593-609, 610-627; b) E. D. Glendening, J. K. Badenhoop and F. Weinhold, *J. Comp. Chem.* 19 (1998) 628-646.
- [57] a) E.B. Wilson, *Phys. Rev.* 45 (1934) 706; b) G. Varsanyi, *Assignment for Vibrational Spectra of Seven Hundred Benzene Derivatives*, Adam Hilger, London, 1974.
- [58] Ch. Gée, S. Douin, C. Crépin, and Ph. Bréchnignac, *Chem. Phys. Lett.* 338 (2001) 130.
- [59] H. Piest, G. von Helden, G. Meijer, *J. Chem. Phys.* 110 (1999) 2010.
- [60] M. Honda, A. Fujii, E. Fujimaki, T. Ebata, N. Mikami, *J. Phys. Chem. A* 107 (2003) 3678.
- [61] R.M.P. Jaiswal, J.E. Katon, G.N.R. Tripathi, *Spectrochim. Acta.* 39A (1983) 275.
- [62] G.N.R. Tripathi, J.E. Katon, *J. Chem. Phys.* 70 (1979) 1383.
- [63] X. Song, M. Yang, E. R. Davidson, and J. P. Reilly, *J. Chem. Phys.* 99, (1993) 3224.
- [64] J. C. Evans, *Spectrochim. Acta* 16 (1960) 428.
- [65] M. Castellá-Ventura and E. Kassab, *Spectrochim. Acta, Part A* 50 (1994) 69.
- [66] M. Takahashi, H. Ozeki, and K. Kimura, *J. Chem. Phys.* 96 (1992) 6399.

- [67] A. Regiec, P. Płoszaj, *New method of obtaining of 5-amino-3-methyl-4-isoxazolecarbohydrazide*, Polish patent application number P.399717 (2012).
- [68] A. Regiec, P. Płoszaj, S. Ryng, P. Wojciechowski, *Vib. Spectrosc.*, *in press*.
- [69] R.A. Kydd and P.J. Krueger, *Chem. Phys. Lett.* 49 (1977) 539.
- [70] O. Bludský, J. Šponer, J. Leszczynski, V. Špirko, and P. Hobza, *J. Chem. Phys.* 105 (1996) 11042.
- [71] X. Zhang, J.M. Smith, and J.L. Knee, *J. Chem. Phys.* 97 (1992) 2843.
- [72] W.E. Sinclair and D.W. Pratt, *J. Chem. Phys.* 105 (1996) 7942.
- [73] Z. Niu, K.M. Dunn, and J.E. Boggs, *Molec. Phys.* 55 (1985) 421.
- [74] G. Rauhut and P. Pulay, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 3093.
- [75] M. Becucci, E. Castellucci, I. López-Tocón, G. Pietraperzia, P.R. Salvi, W. Caminati, *J. Phys. Chem. A* 103 (1999) 8946.
- [76] A.K. Rai, S. Kumar, A. Rai, *Vib. Spectrosc.* 42 (2006) 397.
- [77] E. Alkalin, S. Akyüz, *Vib. Spectrosc.* 22 (2000) 3.
- [78] W. Zierkiewicz, D. Michalska, Th. Zeegers-Huyskens, *J. Phys. Chem.* 104A (2000) 11685.
- [79] N. C. Handy, P. E. Maslen, R. D. Amos, J. S. Andrews, C. W. Murray, and G. J. Laming, *Chem. Phys. Lett.* 197 (1992) 506.
- [80] H. Shirakawa, E.J. Louis, A.G. MacDiarmid, C.K. Chiang and A.J. Heeger, *J Chem Soc Chem Comm* (1977) 579
- [81] T. Ito, H. Shirakawa and S. Ikeda, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* 12 (1974) 11–20.
- [82] C.K. Chiang, C.R. Fischer, Y.W. Park, A.J. Heeger, H. Shirakawa, E.J. Louis, S.C. Gau and A.G. MacDiarmid, *Phys. Rev. Letters* 39 (1977) 1098.
- [83] C.K. Chiang, M.A. Druy, S.C. Gau, A.J. Heeger, E.J. Louis, A.G. MacDiarmid, Y.W. Park and H. Shirakawa, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 1013.
- [84] The Nobel Prize in Chemistry 2000 - Advanced Information. Nobelprize.org. 1 Dec 2012 http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2000/advanced.html
- [85] A. Pron, P. Rannou, *Prog. Polym. Sci.* 27 (2002) 135-190.
- [86] J. Laska; „*Polianilina – otrzymywanie, właściwości, możliwości zastosowań*”, AGH – Uczelniane Wydawnictwa Naukowe – Dydaktyczne, Kraków 2003.
- [87] R.P. Singh, A. Tiwari, A.C. Pandey, *J Inorg Organomet Polym.* 21 (2011) 788–792.
- [88] Y.A. Udum, K. Pekmez, A. Yıldız, *J Solid State Electrochem.* 10 (2006) 110–116.
- [89] T.D. Nguyen, T.A. Nguyen, M.C. Pham, B. Piro, B. Normand, H. Takenouti, *J. Electroanalytical Chemistry* 572 (2004) 225–234.

[90] E. M. Geniès, A. Boyle, M. Lapkowski, C. Tsintavis, *Synth. Met.* 36 (1990) 139.

[91] Z.F. Li, E. Ruckenstein, *Macromolecules* 35 (2002) 9506-9512.

[92] L. Gao, S. Lv, S. Xing, *Synthetic Metals* 162 (2012) 948-952.

2 Inżynieria chemiczna – modelowanie reakcji chemicznych

2.1 Wstęp

W rozdziale przedstawiono dwa wybrane zagadnienia przedstawiające wykorzystanie modelowania komputerowego w inżynierii chemicznej.

Pierwsze z wybranych zagadnień związane jest z opracowaniem modelu enzymatycznej degradacji biopolimerów pozwalającego na analizę zmian wszystkich stężeń substratów, produktów pośrednich oraz końcowych uczestniczących w reakcji enzymatycznej degradacji biopolimerów. Dodatkowo przy opracowywaniu modelu założono iż powinien pozwalać równocześnie na opisywanie reakcji multisubstratowych i multienzymatycznych oraz powinien cechować się dużą elastycznością i posiadać możliwość łatwej modyfikacji pozwalającej na uwzględnienie dodatkowych zjawisk towarzyszących poszczególnym procesom. Model przedstawiono i zweryfikowano dla danych opisujących proces enzymatycznej hydrolizy skrobi przebiegający przy udziale enzymów amylolitycznych.

Drugie prezentowane zagadnienie związane jest z modelowaniem kinetyki reakcji usuwania jonów chromu(III) z wykorzystaniem alg *Spirulina sp.*

Warto podkreślić, iż wybór obu prezentowanych tematów nie był przypadkowy. Pod koniec XX wieku firma Cargil uruchomiła w zakładzie na terenie Bielan Wrocławskich linię do produkcji substancji słodzących, takich jak syropy glukozowe i glukozowo-fruktozowe*, oraz skrobi przemysłowych, wykorzystywanych w przemyśle papierniczym, w produkcji tektury falistej i przemyśle biochemicznym. Substratem do produkcji jest skrobia, będąca polisacharydem i modelowym polimerem, którego proces enzymatycznej degradacji opisano w rozdziale. Natomiast drugi temat związany jest ze zmianami norm ochrony środowiska, które nastąpiły z chwilą włączenia Polski do struktur Unii Europejskiej i wykorzystaniem „przyjaznej” dla środowiska techniki bioakumulacji.

* Na głównej linii technologicznej zakładzie Cargil wspomniane syropy uzyskuje się na skale przemysłową w procesie kwaśnej hydrolizy skrobi (proces nieenzymatyczny). Równolegle we Wrocławiu produkuje się także specjalne odmiany polioli, maltodekstryn, skrobi, lecytyn, fosfolipidów, ksantan, karagenów, alginianów, pektyn i dekstroz do wykorzystania w przemyśle farmaceutycznym oraz kosmetycznym.

2.2 Model enzymatycznej hydrolizy skrobi

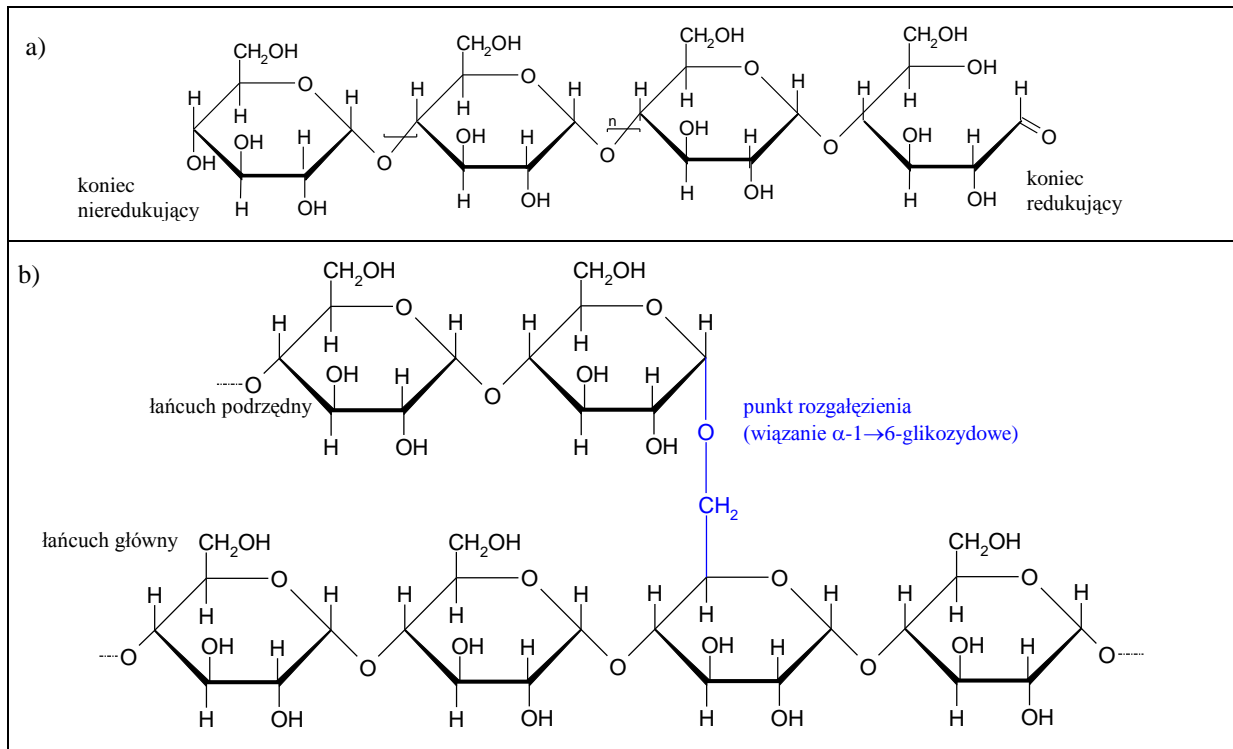
2.2.1 Budowa skrobi

Skrobia [CAS # 9005-25-8] należy do najbardziej rozpowszechnionych w przyrodzie wielocukrów, stanowiąc podstawowy materiał zapasowy w komórkach roślinnych. Powstaje ona w wyniku asymilacji dwutlenku węgla przez fotosyntezujące rośliny. Jest głównym składnikiem węglowodanowym pokarmu człowieka obecnym w większości warzyw, a także we wszystkich potrawach mącznych. O znaczeniu skrobi w gospodarce przekonują liczby. W roku 2008 światowa produkcja skrobi wyniosła około 66 milionów ton. W Uni Europejskiej aktualna produkcja skrobi jest na poziomie 9 milionów ton, z czego około 60% wykorzystywana jest w przemyśle spożywczym, natomiast pozostałe 60% wykorzystywana jest do innych zastosowań przemysłowych* [1, 2].

Pod względem chemicznym jest produktem niejednorodnym, złożonym z dwóch glukanów: amylopektyny (15÷80%) i amylozy (20÷85%). Amyloza jest liniowym polimerem złożonym z reszt D-glukozy powiązanych wiązaniami α -1→4-glikozydowymi (rys 2.1a), natomiast amylopektyna jest polimerem rozgałęzionym, zawierającym dodatkowo pewną ilość wiązań α -1→6-glikozydowych (rys 1.1b)[†] [4]. W roztworach wodnych amyloza tworzy roztwory koloidalne, w przeciwieństwie do amylopektyny, która ogrzana w wodzie pęcznieje i tworzy kłajster (kisiel, krochmal). Stosunek amylozy do amylopektyny w skrobi oraz stosunek ilości wiązań α -1→4 do α -1→6 w cząsteczkach amylopektyny zależy nie tylko od gatunku rośliny, z której pochodzi, ale i od jej wieku, okresu i warunków wegetacji, a także w mniejszym stopniu od sposobu pozyskiwania skrobi. Powyższe różnice w budowie i wielkości cząsteczek skrobi wpływają w sposób znaczący na jej właściwości fizykochemiczne, a także organoleptyczne (patrz rys. 2.2). Średnia masa amylozy ze skrobi ziemniaczanej waha się od 4 do 17 kDa, natomiast amylopektyny od 200 do 600 kDa. Niektóre prace raportują bardziej złożoną budowę skrobi, przedstawiając ją jako „ziarno” złożone z dwóch warstw różniących się wzajemnymi proporcjami amylozy (w większym stopniu skupionej we wnętrzu ziarenek) i amylopektyny (przeważającej w otoczce ziarenek) [5, 6].

* Obecnie na terenie Uni Europejskiej intensywnie rozwija się rynek związany z wykorzystaniem skrobi do biopaliw wyprodukowanym na bazie bioetanolu i benzyny [3]. Typowym surowcem do produkcji bioetanolu jest cukier uzyskiwany ze skrobi w reakcji enzymatycznej.

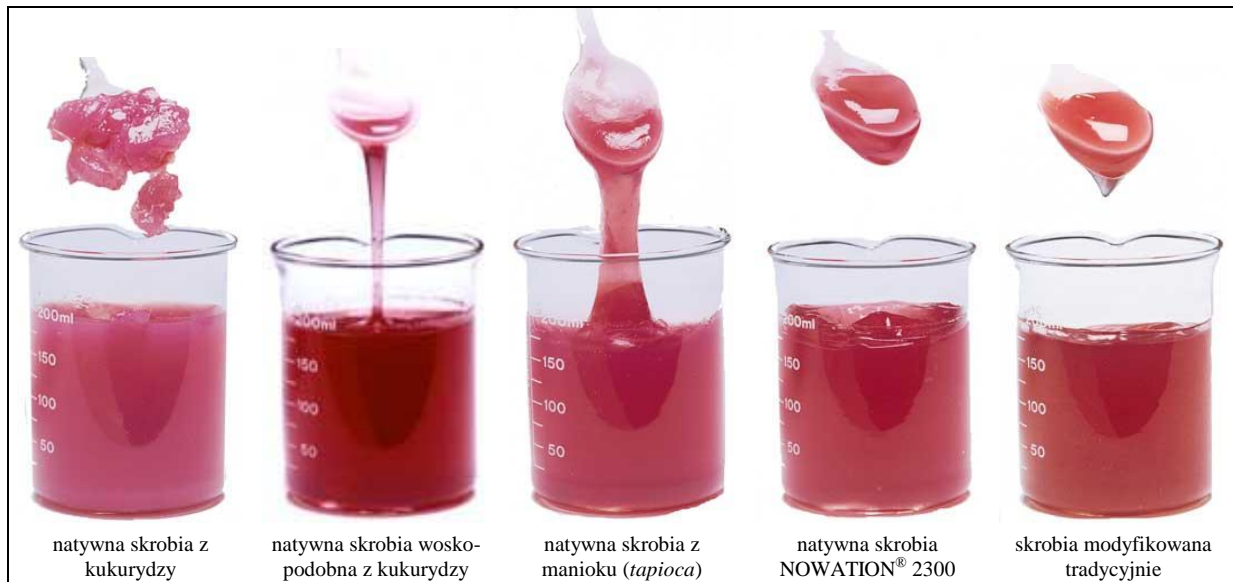
[†] Stosunek liczby wiązań α -1→4-glikozydowych do ilości wiązań α -1→6-glikozydowych określany bywa w literaturze jako stopień polimeryzacji DP (ang. *polimerization degree*).



Rys. 2.1. Budowa cząsteczki skrobi.

a) struktura cząsteczki amylozy;

b) fragment cząsteczki amylopektyny (kolorem niebieskim zaznaczono fragment określany jako punkt rozgałęzienia w cząsteczce).



Rys. 2.2. Porównanie przykładowych typów skrobi (roztwory skrobi zabarwiono czerwonym barwnikiem, wg National Starch and Chemical Company) [7].

2.2.2 Zastosowanie enzymów amylolitycznych

Przemysłowe zastosowanie enzymów* amylolitycznych [EC 3.2.1] nierozdzielnie związane jest z procesami enzymatycznej hydrolizy polocukrów, w tym głównie z hydrolizą skrobi. Mają one szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, a także w przemyśle gorzelniczym, włókienniczym, papierniczym, poligraficznym, stolarski (wyrób klejów), pralniczym, w kosmetyce i lecznictwie.

Z zastosowania enzymów w procesach technologicznych płynie szereg korzyści, m. in.:

- możliwość prowadzenia reakcji w łagodnych warunkach (enzymy obniżają energię aktywacji),
- enzymy cechują się określoną specyficznością, dzięki czemu możliwe jest uzyskanie określonych produktów reakcji,
- katalizują reakcję w małych ilościach w porównaniu z ilością substratu, a ich działanie może być łatwo kontrolowane i jednocześnie łatwo przerwane.

W przypadku enzymów amylolityczny dodatkowo ważne jest, że nie są one toksyczne, nie wpływają one negatywnie na pogorszenie walorów organoleptycznych produktów (np. serów), a stosowane powszechnie w przemyśle enzymy amylolityczne są względnie tanie i łatwo pozyskiwane [5].

Enzymy amylolityczne wykorzystuje się powszechnie na skale przemysłową w procesach upłynniania i scukrzania skrobi do produkcji syropów dekstranowych, wysokomaltozowych, wysokoglukozowych oraz syropów fruktozowych[†] [8]. Etap enzymatycznej hydrolizy jest niezastąpiony w wielu procesach biotechnologicznych, jak chociażby produkcja piwa. Obecnie wzrasta zapotrzebowanie przemysłu na określone produkty pochodne skrobi oraz syropy o ściśle określonych parametrach fizyko-chemicznych. Przykładowe zastosowania skrobi modyfikowanej / przetworzonej w przemyśle spożywczym i farmakologicznym przedstawiono w Tab. 2.1.

Szerokie zainteresowanie procesowi hydrolizy skrobi zawdzięcza się dużemu zapotrzebowaniu przemysłu na pochodne skrobi oraz stosunkowo niskiej cenie surowca i jego

* Pojęcie enzym zaproponował noblista R. Kuhn. W języku greckim *en* 'w' *yme* oznacza zakwaszone ciasto. Jako synonimy słowa enzym używa się także pojęć: biokatalizatory [*gr.*], fermentery [*lac.*] i zacierzy.

[†] Na rynku dolnośląskim potentatem w produkcji syropów glukozowych i fruktozowych (głównie hydroliza kwaśna) jest powstała na terenie Bielán Wrocławskich filia firmy Cargil®.

odnawialności*. Obecnie w wielu krajach świata trwają badania nad możliwością wykorzystania produktów uzyskanych ze skrobi (np. alkoholu etylowego) jako taniego, proekologicznego paliwa [9].

Tab. 2.1. Przykłady zastosowania enzymów amylolitycznych w przemyśle spożywczym i medycynie.

Substancje pochodne skrobi natywnej	Enzymy używany przy produkcji	Przykładowe zastosowania w przemyśle
skrobia modyfikowana	α -amylazy	Przemysł cukierniczy i piekarniczy (poprawienie zdolności wyrastania ciasta); zagęstnik (np. produkcja ketchupów); wypełniacz / substancja stabilizująca / czynnik zapobiegający zbrylaniu się produktów (zupy błyskawiczne), przechowalność produktów spożywczych - czynnik ograniczający powstawanie ziaren lodu oraz regulujący wilgotność Przemysł browarniczy i gorzelniczy (przekształcenie skrobi w sacharydy fermentujące) Produkcja tworzyw i opakowań biodegradowalnych Medycyna: antyuleniace, enkapsulowanie leków, wypełniacze, dezintegranty. Podłoże fluidyzacyjne, czynnik utrzymujący wilgotność, czynnik zapobiegający zbrylaniu się substancji
syropy maltozowe	β -amylazy (α -amylazy – wstępne upłynnianie skrobi)	Przemysł cukierniczy (zapobieganie krystalizacji sacharozy, zwiększanie konsystencji, polepszenie walorów smakowych, wydłużenie trwałości produktów)
syropy glukozowo-maltozowe	glukoamylazy, β -amylazy (α -amylazy – wstępne upłynnianie skrobi)	Produkcja lodów, konfitur i dżemów, syropów owocowych, soków, ciastek, mrożonej żywności
syropy glukozowe	Glukoamylazy (α -amylazy – wstępne upłynnianie skrobi)	Przemysł cukierniczy i pszczelarski
syropy o wysokim wskaźniku cukrów fermentacyjnych	α -amylazy	Przemysł piwowarski i piekarniczy
syropy fruktozowe	izomerazy fruktozowe (izomeryzacja glukozy do fruktozy)	Produkcja napojów (Coca Cola, Pepsi Cola), produkcja żywności dla dietetyków (fruktoza metabolizowana jest bez udziału insuliny)
syropy wysokofruktozowe	izomerazy fruktozowe	Przetwórstwo owoców, produkcja konfitur i syropów owocowych
syropy maltodekstrynowe	α -amylazy	Przemysł spożywczy (regulatory wilgotności, wypełniacze); przemysł cukierniczy (produkcja lodów, mrożonek, cukierków), przemysł farmakologiczny (enkapsulacja leków - ochrona przed utlenianiem)
maltoza krystaliczna	β -amylazy	Wlewy dożylnie u dietetyków

* Przyjmuje się, że z jednego ziarna kukurydzy otrzymuje się po jednym okresie wegetacji około 800 nowych ziaren.

2.2.3. Charakterystyka enzymów amylolitycznych

Amylasy są enzymami produkowanymi zarówno przez rośliny, zwierzęta i jak i grzyby. U kręgowców pełnią one funkcje typowych enzymów trawiennych i są obecne m. in. w ślinie i wydzielinie trzustkowej. W świecie roślinny, występują one zwłaszcza w ziarnach kiełkujących zbóż, gdzie następuje ich synteza mająca za zadanie uruchomienie zgromadzonego w formie skrobi materiału energetycznego. Podstawowe kryteria podziału enzymów amylolitycznych spotykane w literaturze przedstawiono w Tab. 2.2.

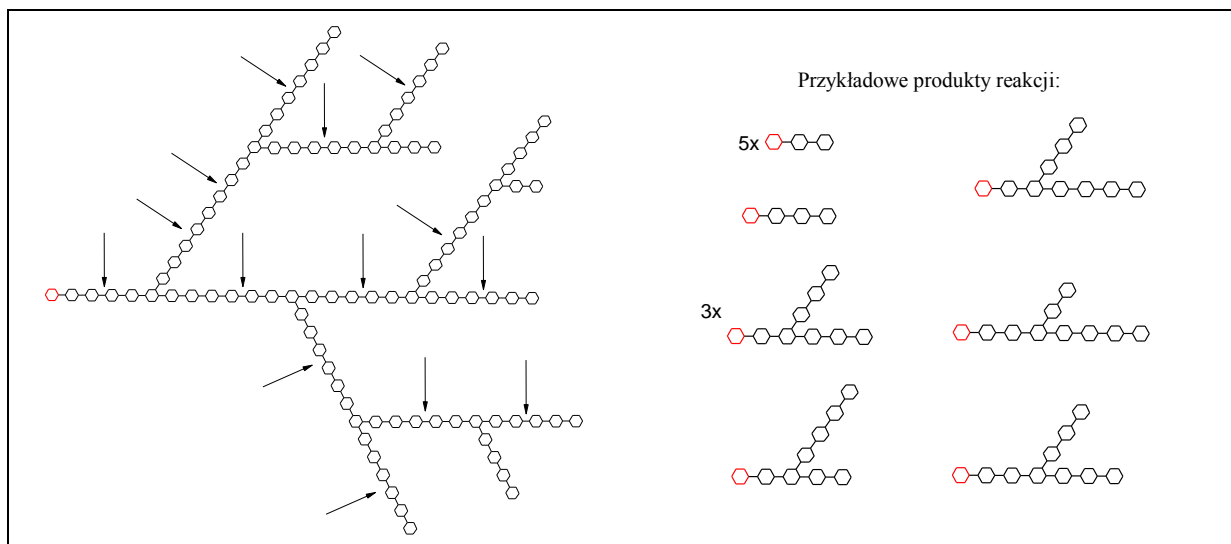
Tab. 2.2. Wybrane kryteria podziału enzymów amylolitycznych [5, 8, 10, 11, 12].

Kryterium podziału enzymów amylolitycznych:	Typy enzymów amylolitycznych:
❖ ze względu na typ hydrolizowanego wiązania glikozydowego	<input type="checkbox"/> hydrolizujące wiązania α -1,4-glikozydowe: <ul style="list-style-type: none"> • α-amylazy, • β-amylazy, • <i>endo</i>-α-amylazy. <input type="checkbox"/> hydrolizujące wiązania α -1,6-glikozydowe: <ul style="list-style-type: none"> • enzymy znoszące rozgałęzienia (izoamylazy, pullulanazy) <input type="checkbox"/> hydrolizujące wiązania α -1,4- i α -1,6-glikozydowe: <ul style="list-style-type: none"> • glukoamylazy, • pullulenazy.
❖ ze względu na miejsce hydrolizowanego wiązania glikozydowego w cząsteczce skrobi (cięcie „z brzegu” lub „wewnątrz łańcucha”)	<input type="checkbox"/> endoamylazy: <ul style="list-style-type: none"> • α-amylazy, • pullulenazy, • cyklodekstrynazy. <input type="checkbox"/> egzoamylazy: <ul style="list-style-type: none"> • β-amylazy, • glukoamylazy, • <i>egzo</i>-α-amylazy.
❖ ze względu na zachodzące procesy	<input type="checkbox"/> amylazy upłynniające: <ul style="list-style-type: none"> • α-amylazy, • izoamylazy, • pullulenazy, • cyklodekstrynazy. <input type="checkbox"/> amylazy scukrzające: <ul style="list-style-type: none"> • β-amylazy, • glukoamylazy, • <i>egzo</i>-α-amylazy.
❖ ze względu na pochodzenie	<input type="checkbox"/> roślinne, <input type="checkbox"/> zwierzęce, <input type="checkbox"/> bakteryjne, <input type="checkbox"/> grzybowe.
❖ ze względu na formę anomeryczną produktów	<input type="checkbox"/> amylazy uwalniające produkty w formie anomerycznej (np. α -amylazy, cyklodekstrynazy), <input type="checkbox"/> amylazy uwalniające produkty w formie nieanomerycznej (β -amylazy i glukoamylazy).
❖ ze względu na budowę przestrzenną oraz centów aktywnych amylaz	<input type="checkbox"/> struktura walca (β/α) ₈ , <input type="checkbox"/> struktura (β/α) ₅ { β -amylazy}, <input type="checkbox"/> struktura walca (α/α) {glukoamylazy}.
❖ ze względu na właściwości fizykochemiczne	<input type="checkbox"/> termostabilne*, <input type="checkbox"/> „kwaśne”, „zasadowe” (optimum pH), <input type="checkbox"/> metalozależne (wymagające obecności jonów metali, np. Mg ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺ lub wrażliwe na obecność jonów Ca ²⁺).
❖ ze względu na czynnik wywołujący inhibicje enzymu	<input type="checkbox"/> inhibowane substratem, <input type="checkbox"/> inhibowane produktem (produktami) reakcji, <input type="checkbox"/> inhibowane (ulegające inaktywacji) pod wpływem innego czynnika.
❖ ze względu na mechanizm inhibicji	<input type="checkbox"/> enzymy ulegające inhibicji kompetycyjnej, niekompetycyjnej, akompetycyjnej, itp.
❖ ze względu na proces technologiczny	<input type="checkbox"/> enzymy upłynniające (endoamylazy; głównie α -amylazy), <input type="checkbox"/> enzymy scukrzające (egzoamylazy, głównie β -amylazy i glukoamylazy).

* Oprócz poszukiwań enzymów produkowanych przez tzw. termofile i hipertermofile [13], możliwych do zastosowania w podwyższonych temperaturach, obecnie wzrasta zainteresowanie przemysłu także amylazami produkowanymi przez organizmy „zimnolubne” [14], których zastosowanie pozwala zredukować koszty związane z podgrzewaniem mieszaniny reakcyjnej oraz dodatkowo gwarantuje stabilność produktów hydrolizy.

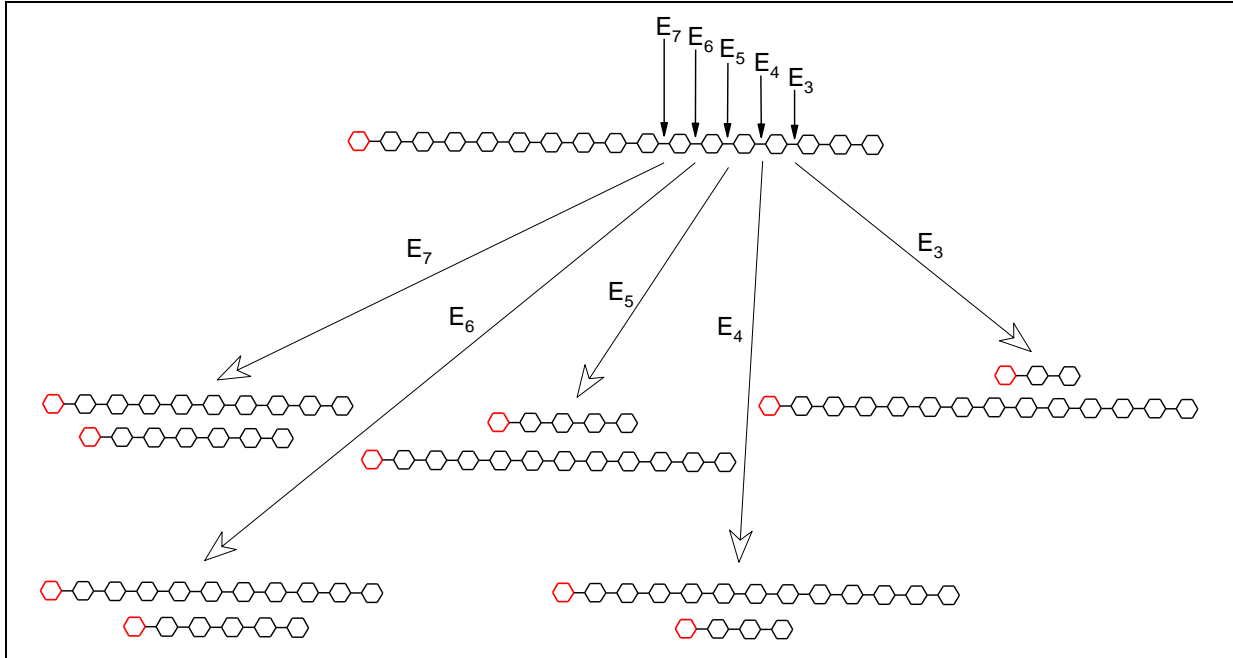
Enzymy amylolityczne, zgodnie z klasyfikacją stworzoną w 1961 roku przez Komisję Enzymową Międzynarodowej Unii Biochemicznej, zaliczane są do klasy hydrolaz, podklasy hydrolaz atakujących wiązania glikozydowe (EC 3.2.). Klasyfikacja na podpodklasy oparta jest na położeniu hydrolizowanego wiązania glikozydowego w cząsteczce substratu. W dalszej części rozdziału przedstawiono schemat działania enzymów amylolitycznych oraz wybranych enzymów związanych z procesem hydrolizy skrobi [5, 11, 12].

α -amylazy (EC 3.2.1.1) - hydrolizują wiązania α -1,4-glikozydowe ulokowane wewnątrz cząsteczki skrobi. Większość α -amylaz nie hydrolizuje wiązań α -1,4-glikozydowych ulokowanych w bezpośrednim sąsiedztwie miejsc rozgałęzienia w cząsteczkach amylopektyny. Schemat działania α -amylazy na cząsteczkę amylopektyny przedstawiono na rys. 2.3.



Rys. 2.3. Schemat ataku α -amylazy na cząsteczkę amylopektyny. Podjednostki glukozy w cząsteczkach skrobi zaznaczono sześciokątami, miejsca ataku enzymu na wiązania glikozydowe zaznaczono strzałkami, czerwonym kolorem oznaczono koniec redukujący w łańcuchu.

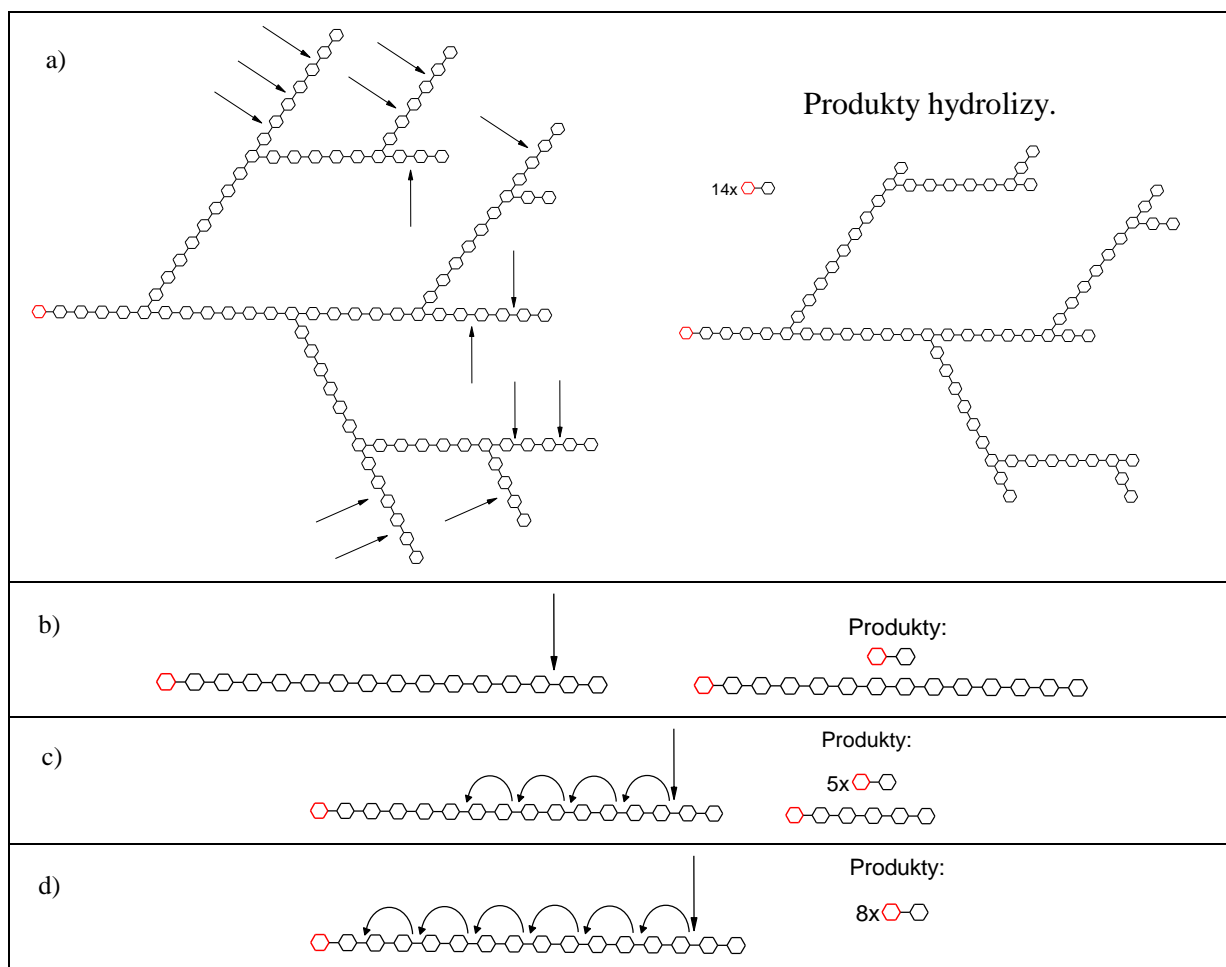
egzo- α -amylazy - katalizują reakcję uwalniania od końców nieredukujących skrobi liniowych oligosacharów. W zależności od typu enzymu zawierają one od trzech do sześciu reszt glukozywych.



Rys. 2.4. Schemat ataku *egzo- α -amylaz* na cząsteczkę amylozy, zaznaczono miejsca ataku poszczególnych typów *egzo- α -amylaz* (oznaczenia zgodne z poprzednim rysunkiem).

pullulanazy (EC 3.2.1.41) - hydrolizują wiązania α -1,6-glikozydowe w cząsteczce skrobi. Wyróżniane są także amylopullulanazy i neopullulanazy hydrolizujące zarówno wiązania α -1,6-glikozydowe, jak i wiązania α -1,4-glikozydowe. Produktami reakcji hydrolizy skrobi przy udziale amylopullulanaz i neopullulanaz jest mieszanina krótkich oligochacharydów pozbawiona praktycznie dekstryn granicznych zawierających wiązania α -1,6-glikozydowe.

β -amylazy (EC 3.2.1.2) - katalizują hydrolizę wiązań α -1,4-glikozydowych między drugą, a trzecią podjednostką glukozy licząc od końca nieredukującego w cząsteczce skrobi. W zależności od wielkości od budowy centrum aktywnego enzymu, reakcja hydrolizy skrobi, zostaje zatrzymana w odległości od 2 do 5 podjednostek glukozy od miejsca położenia wiązania α -1,6-glikozydowego. Przyjmuje się, że niektóre β -amylazy ulegają inhibicji kompetycyjnej maltoza uwalniana w wyniku reakcji. Na rys. 2.5. przedstawiono schematy ataku β -amylazy na cząsteczkę amylopektyny oraz różnych mechanizmów reakcji.



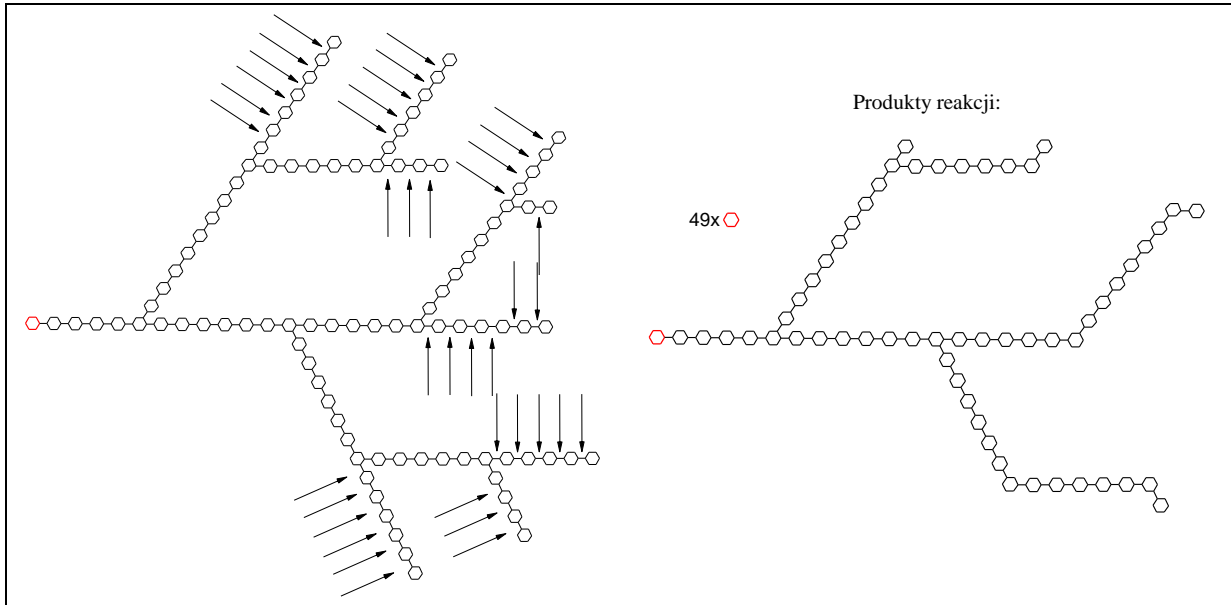
Rys. 2.5. Schemat ataku β -amylazy (oznaczenia jak na poprzednim rysunku).

a) atak β -amylazy na cząsteczkę amylopektyny,

Możliwe mechanizmy działania β -amylazy:

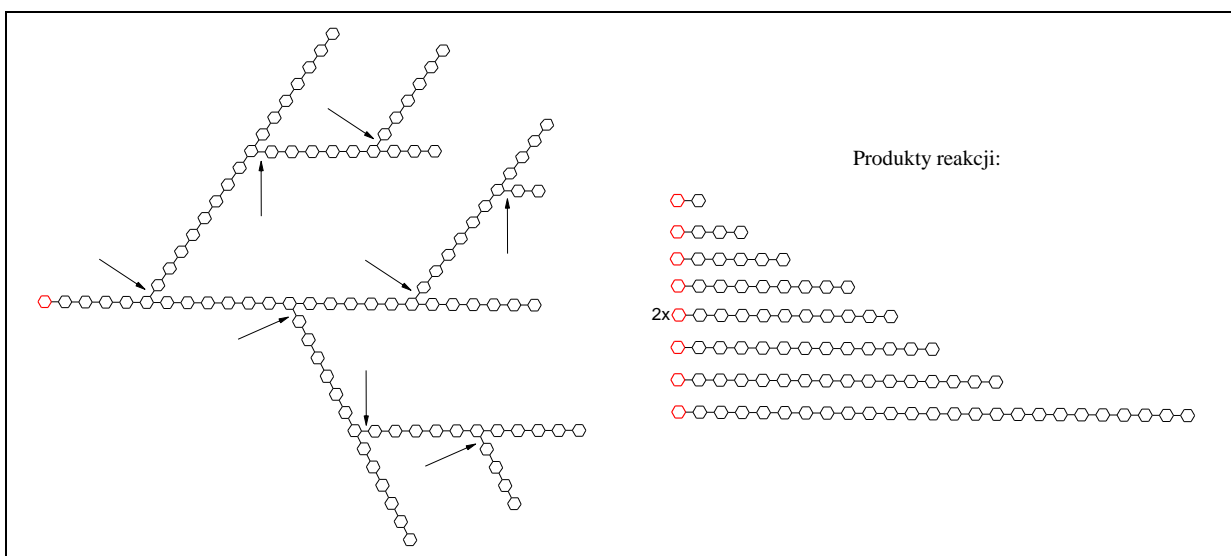
- b) atak losowy (ang. *random attack*) - adsorpcja, pojedyncze cięcie wiązania glikozydowego, desorpcja z uwolnieniem jednej cząsteczki maltozy,
- c) wielokrotny atak łańcuchowy (ang. *multiple chain attack*) - adsorpcja, seria cięć prowadząca do sekwencyjnego uwalniania cząsteczek maltozy, desorpcja,
- d) pojedynczy atak łańcuchowy (ang. *single chain attack*) - adsorpcja, hydroliza do końca łańcucha co drugiego wiązania α -1,4-glikozydowego u uwalnianiem cząsteczek maltozy, desorpcja.

glukoamylazy (γ -amylazy) (EC 3.2.1.3) - uwalniają cząsteczki glukozy, hydrolizując wiązania α -1,4-glikozydowe od końca nieredukującego łańcucha poliglukozowego. Większość glukoamylaz posiada zdolność hydrolizy także wiązań α -1,6-glikozydowych znajdujących się przy nieredukującej reszcie glukozowej w łańcuchu.



Rys. 2.6. Schemat ataku glukoamylazy na cząsteczkę amylopektyny (oznaczenia zgodne z poprzednimi rysunkami).

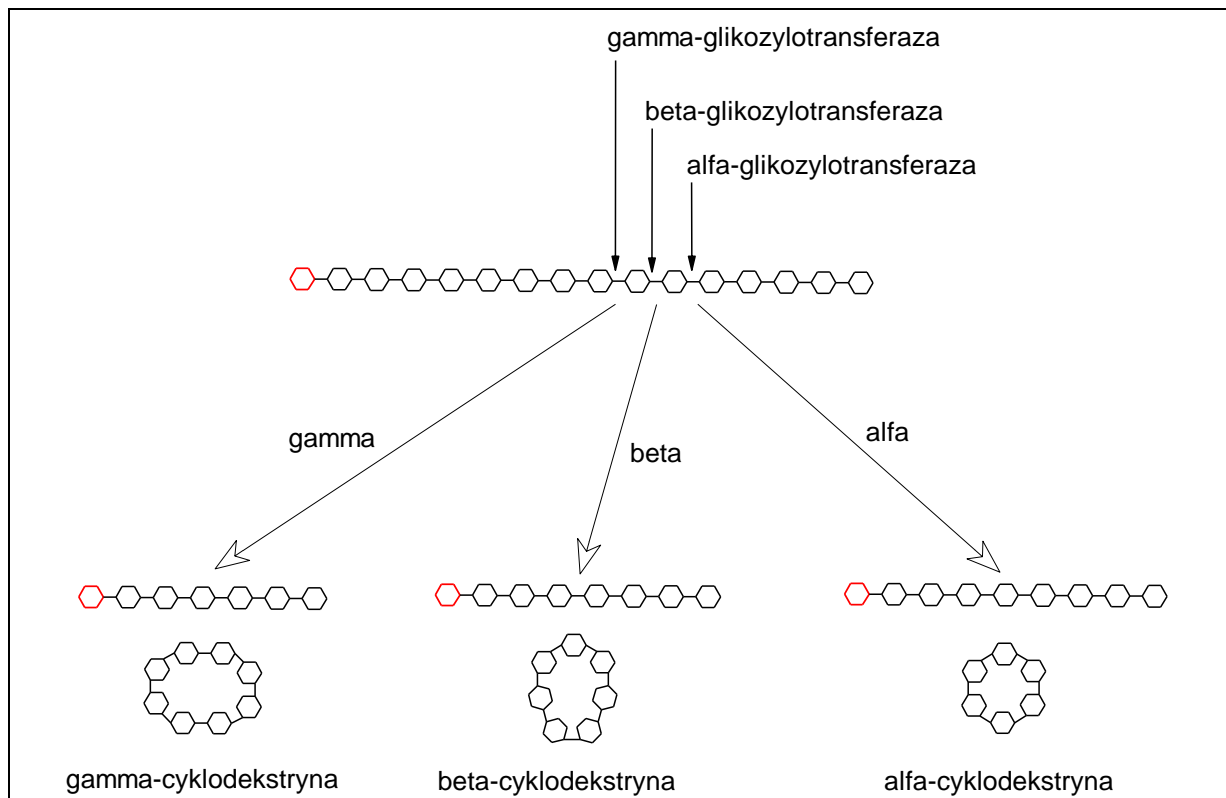
izoamylazy (EC 3.2.1.68) - hydrolizują wiązania α -1,6-glikozydowe wewnątrz cząsteczki skrobi, powodując uwolnienie liniowych polisacharydów. Potocznie izoamylazy nazywane są enzymami znoszącymi rozgałęzienia.



Rys. 2.7. Schemat ataku izoamylazy na cząsteczkę amylopektyny (oznaczenia zgodne z poprzednimi rysunkami).

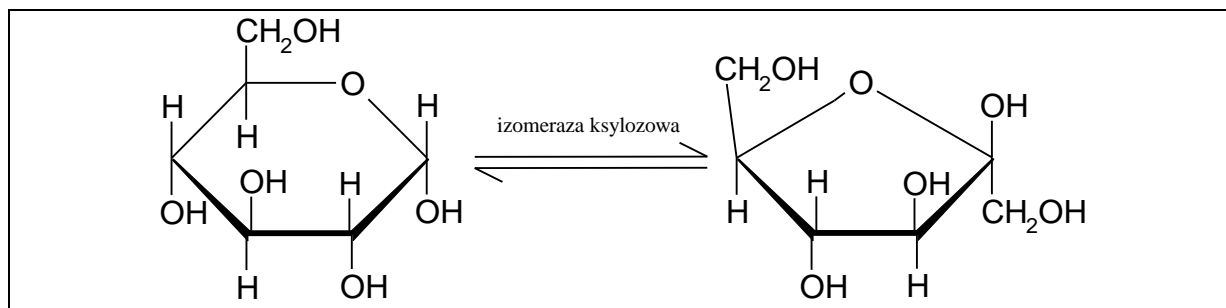
Oprócz hydrolaz w procesach związanych konwersją skrobi i glukozy stosowane są także inne enzymy, takie jak:

cyklotransferazy (EC 2.4.1.19) - należą do klasy transferaz, i podobnie jak *egzo- α -amylazy* katalizują reakcję uwalniania oligosacharydów od końców nieredukujący skrobi. W przeciwieństwie jednak do *egzo- α -amylazy* uwalniane produkty nie są w formie liniowej, lecz mają formę zamkniętych pierścieni cyklodekstrynowych (rys. 2.8.).



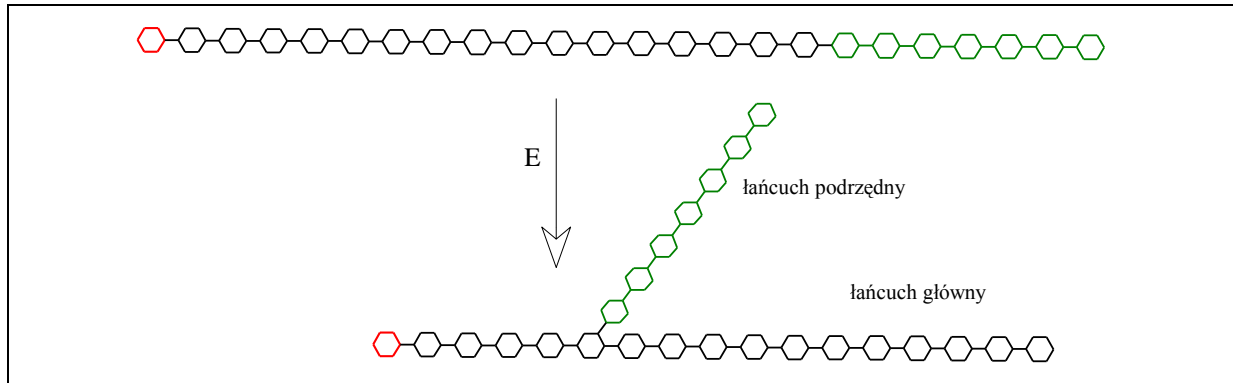
Rys. 2.8. Schemat ataku cyklotransferaz na cząsteczkę amylozy, zaznaczono miejsca ataku poszczególnych typów cyklotransferaz (oznaczenia zgodne z poprzednimi rysunkami).

izomerazy ksylozowe (izomeraza glukozowa) (EC 5.3.1.5) - wykorzystywana przemysłowo głównie w procesie izomeryzacji D-glukozy do D-fruktozy (rys. 2.9.).



Rys. 2.9. Schemat działania izomerazy ksylozowej, na przykładzie izomeryzacji glukozy do fruktozy.

glikozylotransferaza rozgałęzień α -glukanu (amylo-1,4 \rightarrow 1,6-glikozylotransferaza), katalizuje reakcje przeniesienia fragmentu liniowego łańcucha poliglukozowego z utworzeniem wiązania α -1,6-glikozydowego, zgodnie ze schematem przedstawionym na rys. 2.10.



Rys. 2.10. Schemat działania glikozylotransferazy rozgałęzień α -glukanu na cząsteczkę amylozy. Kolorem zielonym zaznaczono przenoszony fragment poliglukozowy, pozostałe oznaczenia zgodnie z poprzednimi rysunkami.

Należy tutaj zaznaczyć, że nawet enzymy otrzymywane z różnych mutacji danego szczepu bakterii mogą się różnić powinowactwem do substratu, wydajnością procesu konwersji skrobi, a także wrażliwością na temperaturę. [15]

Enzymy, w tym także enzymy amylolytyczne mogą także prowadzić reakcje odwrotne (ang. *reverse reaction*). Uwidacznia się to szczególnie w końcowym etapie reakcji, gdy występuje niedobór substratu, przy jednocześnie wysokim stężeniu produktu [11, 12]. Przykładowo glukoamylaza może katalizować reakcję „łączenia” się cząsteczek glukozy z utworzeniem m.in.: α,β -trehalozy (α -D-glukopyranozylo- β -D-glukopyranozy), kojibiozy (2-O- α -D-glukopyranozylo-D-glukozy), nigerozy (3-O- α -D-glukopyranozylo-D-glukozy), maltozy (4- α -D-glukopyranozylo-D-glukozy), izomaltozy (6-O- α -D-glukopyranozylo-D-glukozy), maltotriozy (4-O- α -D-glukopyranozylo-maltozy), panozy (6-O- α -D-glukopyranozylo-D-maltozy), izopanozy (4-O- α -D-glukopyranozylo-izomaltozy) oraz izomaltotriozy (6-O- α -D-glukopyranozylo-D-izomaltozy) [16].

2.2.4 Technologia

Schemat typowego procesu technologicznego pozyskiwania skrobi kukurydzianej i jej obróbki przedstawiono na rys. 2.11.



Rys. 2.11. Schemat procesu technologicznego produkcji z kukurydzy skrobi modyfikowanej (wg *National Starch and Chemical Company* [7]).

2.2.5 Opis kinetyki reakcji

Większość modeli kinetycznych stosowana przy opisie reakcji chemicznych określa zmianę stężenia jednego składnika układu (np. substratu lub produktu) podczas trwania procesu, natomiast stężenia pozostałych reagentów określane jest z bilansu reakcji. Przykładem może być reakcja przebiegająca wg teorii Michaelisa-Menten [17], z utworzeniem odwracalnego kompleksu enzym-substrat, podlegającego dalszej nieodwracalnej przemianie do produktu i wolnej cząsteczki enzymu według schematu:



Dla powyższej reakcji zgodnie z modelem Michaelisa-Menten szybkość powstawania produktu określona jest jako:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} = \frac{k_3 \cdot [E] \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Natomiast szybkość ubywania substratu, możemy wyznaczyć z bilansu reakcji:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{dP}{dt}$$

Stosując przedstawiony model Michaelisa-Menten lub inny model monosubstratowy zakładający powstanie jednej klasy produktów, traktujemy skrobię jako jednorodny substrat, którego hydroliza prowadzi do powstania jednego bądź zaledwie kilku typów cukrów*.

Jednakże w rzeczywistości proces hydrolizy skrobi jest o wiele bardziej złożony, a w celu wierniejszego opisanie jego kinetyki konieczne jest uwzględnienie takich zjawisk jak [11, 12, 18, 19, 20]:

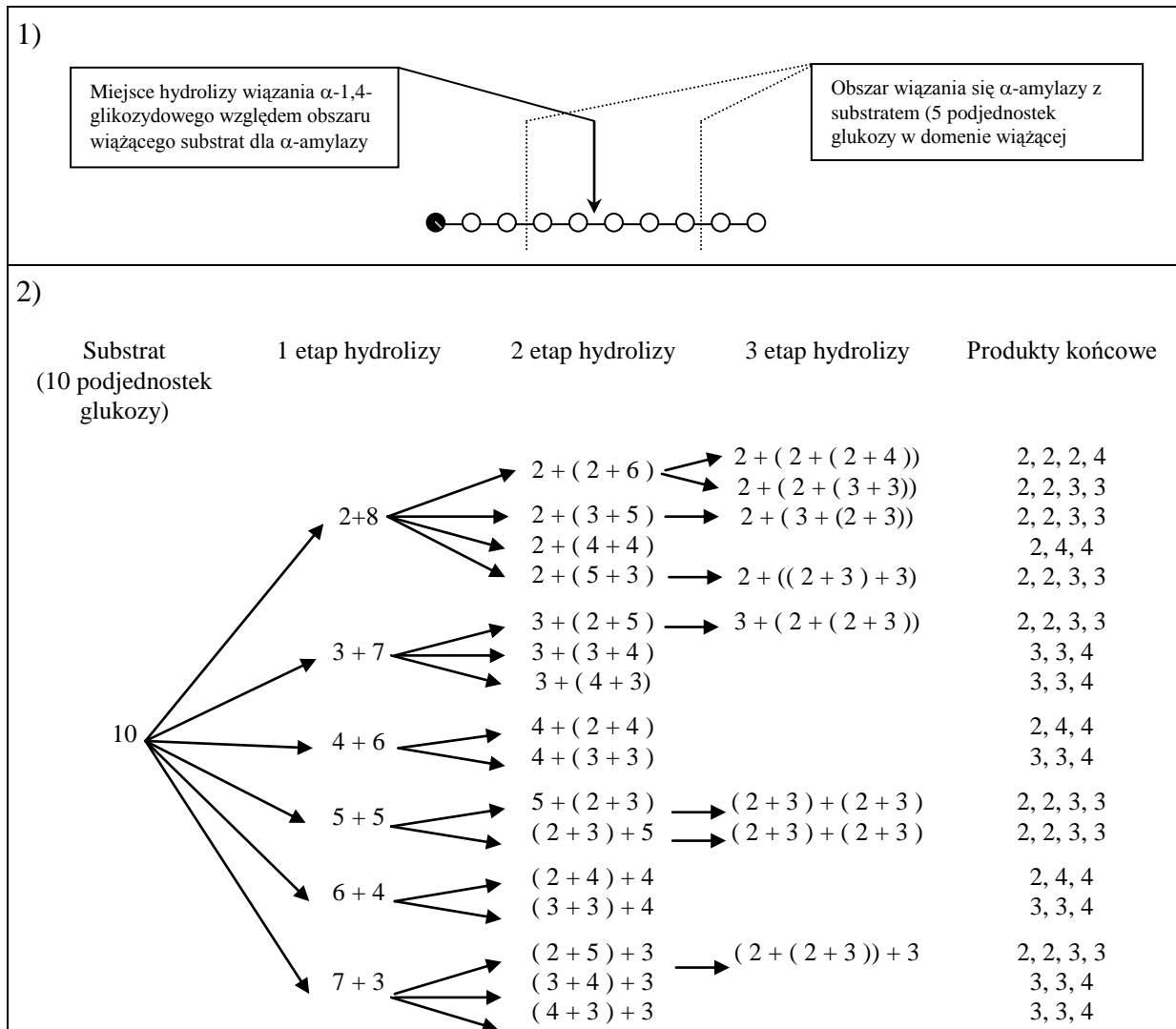
- multisubstratowość – substratami są cząsteczki amylozy i amylopektyny, o różnej masie cząsteczkowej oraz różnym stopniu polimeryzacji,
- powstawanie wielu produktów pośrednich, które mogą być substratami w dalszych etapach reakcji,
- w reakcji powstaje szereg produktów końcowych, takich jak np.: glukoza, maltoza, maltotrioza, dekstryny graniczne,
- wieloenzymatyczność – w szeregu procesach przemysłowych stosowany jest układ enzymów o różnym działaniu i różnym powinowactwie do substratu,

* Uniemożliwia to przykładowo dokładne określenie końcowego składu mieszaniny reakcyjnej gdy produktami reakcji są różne oligosacharydy

- dodatkowo w układzie mogą zachodzić zjawiska związane z konkurencją, synergizmem lub inhibicją enzymów, które zostały omówione w dalszej części pracy.

Nawet jeśli rozpatrzmy reakcję hydrolizy liniowego polisacharydu złożonego z dziesięciu podjednostek glukozy pod wpływem α -amylazy przebiegającej wg schematu na rys. 2.12. widzimy, że reakcja może potoczyć się wieloma drogami z utworzeniem różnych produktów pośrednich i końcowych. Możliwość potoczenia się reakcji wieloma drogami opisuje się poprzez podanie różnych stałych kinetycznych opisujących każdą reakcję cząstkową (równanie multisubstratowe Michaelisa-Menten [21]) lub poprzez podanie odpowiednich prawdopodobieństw zajścia poszczególnych reakcji (metoda Monte Carlo [22, 23, 24])^{*}. W praktyce zastosowanie równań multisubstratowych jest wysoce kłopotliwe w przypadku procesu hydrolizy skrobi, gdyż nawet opis przykładu przedstawionego na rys. 2.12. pociąga za sobą konieczność rozwiązania układu siedemnastu równań kinetycznych, a w przypadku opisu typowej cząsteczki amylopektyny liczba pojedynczych równań kinetycznych może sięgać kilkuset tysięcy. Dlatego coraz większą popularnością cieszą się modele bazujące na metodzie Monte Carlo rozpatrujące prawdopodobieństwa zajścia reakcji cząstkowych [25, 26]. Umożliwiają one m. in. analizę poszczególnych etapów reakcji oraz wyznaczenie stężenia poszczególnych reagentów w końcowej mieszaninie reakcyjnej. Gwałtowny wzrost zainteresowania metodami Monte Carlo można także upatrywać w rozwoju mikroelektroniki, gdyż obecnie nawet na średniej klasy komputerze osobistym można symulować skomplikowane reakcje wieloenzymatyczne.

^{*} Użycie „prostego” modelu Michaelisa-Menten do opisu prezentowanego przykładu, pozwoliłoby jedynie na analizę zmiany sumarycznego stężenia wszystkich cząsteczek cukrów powstających w reakcji, bez możliwości rozróżnienia typów poszczególnych cukrów oraz określenia składu mieszaniny reakcyjnej podczas procesu hydrolizy.



Rys. 2.12. Schemat hydrolizy cząsteczki amylozy (maltodekanozy) przy udziale α -amylazy.

1). Przykładowy schemat wiązania się α -amylazy do substratu. Na rysunku przyjęto, że domena wiążąca α -amylazy asocjuje z pięcioma kolejnymi podjednostkami glukozy, a hydroliza wiązania α -1,4-glikozydowego następuje w domenie wiążącej, między drugą, a trzecią podjednostką glukozy licząc od końca redukującego w łańcuchu polocukru.

2). Możliwe warianty reakcji hydrolizy łańcucha amylopektyny zawierającego 10 podjednostek glukozy przy udziale α -amylazy o preferencjach substratowych zdefiniowanych na rys. 1.1. Przyjęto, że hydroliza wiązania następuje jedynie, gdy cała domena wiążąca α -amylazy związana jest z substratem.

Na rysunku zaznaczono liczbę podjednostek glukozy w polocukrach (2 - maltoza, 3 - maltotrioza, 4 - maltotetroza, itd.)

Dodatkowym problemem spotykanym przy opisie kinetyki reakcji hydrolizy polimerów związany jest o określaniu stężenia reagentów w układzie. Przykładowo w przypadku hydrolizy skrobi przy udziale α -amylazy upływniającej w pierwszym etapie reakcji stężenie masowe surowca jest praktycznie stałe, podczas gdy stężenie molowe surowca paradoksalnie rośnie! Natomiast w przypadku hydrolizy skrobi przy pod wpływem β -amylazy, stężenie masowe surowca ulega zmianie (odcinane są reszty maltozy), natomiast stężenie molowe nie ulega zmianie. Warto tutaj zaznaczyć, iż cząsteczki amylopektyny o tej samej masie mogą mieć różną ilość miejsc podatnych na działanie enzymu, np. w przypadku β -amylazy ilość miejsc podatnych na działanie enzymu w cząsteczce amylopektyny odpowiada ona ilości wolnych końców redukujących zawierających co najmniej cztery podjednostki glukozy. Wzmiankowane powyżej uwarunkowania narzucają dodatkowe trudności przy opisywaniu reakcji i interpretowaniu wyników. Należy także zaznaczyć, że kinetyka reakcji zależy od pochodzenia zarówno enzymu użytego w reakcji jak i źródła skrobi [27, 28] i może się ona zmieniać podczas trwania reakcji*. Zestawienie wybranych modeli kinetycznych stosowanych do opisu kinetyki reakcji degradacji biopolimerów przedstawiono w tabeli 1.3.

Problem określenia stężenia substratu można rozwiązać wyrażając stężenia poprzez podanie całkowitej liczby wiązań glikozydowych obecnych w substracie, bądź poprzez podanie liczby wiązań w cząsteczce substratu podatnych na działanie enzymu [22, 25, 26, 29, 30, 31]. Rozpatrując przykład przedstawiony na rys. 2.12. można powiedzieć, iż w cząsteczce substratu występuje 9 wiązań α -1,4-glikozydowych, ze czego 6 podatnych jest na działanie enzymu, dlatego w pierwszym etapie reakcji możliwych jest sześć różnych wariantów reakcji równoległej prowadzących do powstania produktów hydrolizy. Przyjęcie powyższego rozwiązania w prosty sposób umożliwia między innymi określenie ilości substratu podatnego na działanie enzymu, śledzenie postępu reakcji, a także określenia ilości możliwych reakcji współbieżnych.

* Dotyczy to zwłaszcza przypadku gdy w pierwszym etapie reakcji enzym hydrolizuje lepiej dostępny i bardziej podatny na jego działanie substrat, prowadząc do pozostania w układzie cząsteczek substratu gorzej hydrolizowanych. W praktyce często jest widoczna zmiana kinetyki na pierwszorzędową pod koniec reakcji.

Tab. 2.3. Przykładowe modele kinetyczne stosowane do opisu reakcji enzymatycznej degradacji biopolimerów (w Tabeli przyjęto oznaczenia za autorami poszczególnych artykułów).

Enzym (enzymy)	Warunki eksperymentu [literatura]	Proponowany opis kinetyki reakcji
α -amylaza z <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> oraz <i>Bacillus licheniformis</i>	skrobia pszenna, 50°C [26]	iteracyjny model stochastyczny
α -amylaza z <i>Schwanniomyces castelli</i>	1% skrobia; 32°C; pH 5,0 [32]	równanie Michaelisa-Menten z inhibicją produktem reakcji: $v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[P]}{K_i}\right)}$
α -amylaza z <i>Saccharomycopsis fibuliger</i>	0,1% ÷ 0,9% skrobia; 32°C; pH 4,8 [33]	równanie Michaelisa-Menten z inhibicją produktem reakcji
α -amylaza z <i>Bacillus licheniformis</i> (Termamyl 120L)	1% ÷ 8% skrobia kukurydziana; 100°C; pH 6,0 [34]	równanie Michaelisa-Menten
α -amylaza ze słodu	ekstrakt słodowy; 40 ÷ 70°C [35]	reakcje pierwszego rzędu dla każdego produktu; reakcja pierwszego rzędu opisująca dezaktywację enzymu
α -amylaza z <i>Bacillus licheniformis</i> (Termamyl 60L)	35% ÷ 55% skrobia pszeniczna; 80°C [36]	model nieliniowy: $v = f(c_s, c_w, c_E)$
α -amylaza z <i>Bacillus licheniformis</i> (Termamyl 60L)	30% ÷ 50% skrobia pszeniczna; 90 ÷ 120°C [37]	nieodwracalna reakcja pierwszego rzędu
α -amylaza z <i>Bacillus licheniformis</i> (Termamyl)	1% skrobia kukurydziana; 60 ÷ 65°C; pH = 6,0 [38]	$\frac{dm}{dt} = f(k, [E_t], \alpha, m)$
α -amylaza z <i>Bacillus subtilis</i>	1% skrobia pszeniczna [39]	następcze reakcje pierwszorzędowe
α -amylaza (Termamyl Novo Laboratories)	skrobia kukurydziana; 60°C ÷ 80°C; pH 6,0 [39]	model upłynniania bazujący na zmianie masy ziaren skrobi; uwzględniono pierwszorzędową reakcję dezaktywacji enzymu: $E(t) = E_0 \cdot e^{-k_E \cdot t}$
α -amylaza z <i>Bacillus licheniformis</i>	6,6% ÷ 40% skrobia; 100°C; pH 7,0 [40]	równanie Michaelisa-Menten
α -amylaza z <i>Bacillus stearothermophilus</i>	24% ÷ 36% skrobia kukurydziana; 93 ÷ 115°C; pH 5,3 ÷ 6,7; 0 ÷ 200 ppm wapnia [41]	pierwszorzędowa dezaktywacja enzymu i kinetyki upłynniania skrobi
α -amylaza z <i>Bacillus sp.</i> typ IIA (Sigma)	skrobia ziemniaczana (Aldrich); 20°C; pH 4,5 [30]	metoda całkowa połączona z symulacją komputerową: $t = \frac{1}{k \cdot c_E} \cdot (c_{s0} - c_s + K_m \cdot \ln \frac{c_{s0}}{c_s})$
α -amylaza z trzustki wieprzowej (EC 3.2.1.1)	skrobia ziemniaczana; 40°C; pH 6,9 [29]	symulacja Monte Carlo z atakiem wielokrotnym
glukoamylaza z <i>Rhizopus niveus</i>	maltozooligosacharydy; 25°C; pH 4,5 ÷ 5,2 [42]	atak losowy
glukoamylaza z <i>Rhizopus delmar</i>	maltoza, skrobia Wako, skrobia Katayama; 50°C; pH 4,5 [43]	zmodyfikowane równanie Michaelisa-Menten z inhibicją produktami (parametry kinetyczne K_M i V_m zmieniają się liniowo w zależności od masy substratu)
glukoamylaza	35% maltodekstryna; pH 4,5 [44]	kinetyka Michaelisa-Menten z inhibicją kompetycyjną produktem

endo-(1→3),(1→4)-β-D-glukanaza	β-glukan (masa 216 kDa oraz 413 kDa) [22]	symulacja Monte Carlo (<i>pojedynczy atak losowy</i>), określone stężenie „wykrywalnych” substratów: $W_d = W_o (1 + \alpha t) e^{-\alpha t}$
α-amylaza z <i>Bacillus licheniformis</i> ; izoamylaza z <i>Pseudomonas amyloclavata</i>	amylaza i amylopektyna; 50°C; pH 6,0 [45,46]	model Michaelisa-Menten rozpatrujący cztery typy reakcji przebiegających w roztworze i zakładający inhibicje niskocząsteczkowymi produktami reakcji
α-amylaza z <i>Bacillus subtilis</i> (Koch-Light 0394t); β-amylaza ze słodkich ziemniaków (Boehringer 15471)	dwie frakcje skrobi (1%); α-amylaza: 30°C; pH 5,5; β-amylaza: 30°C; pH 4,8 [47]	dwie pierwszorzędowe reakcje następcze: $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C$ (atak pojedynczy, atak wielokrotny, atak na kilka łańcuchów)
α- i β-amylaza	słód; 35 ÷ 75°C [48]	układ reakcji równoległo-następczych dla nierozpuszczalnych i rozpuszczalnych składników
α-, β-amylaza, glukoamylaza i pulullanaza	skrobia ziemniaczana; α-amylaza (<i>Bacillus sp.</i>) i β-amylaza jęczmienna immobilizowana na nośniku akrylowym [25]	model iteracyjny wykorzystujący metodę Monte Carlo
α-amylaza z <i>Bacillus subtilis</i> ; glukoamylaza	skrobia ziemniaczana; 30°C; pH 5,25 [49]	przyrost rozpuszczalnych cukrów: $\frac{d[G]}{dt} = \frac{V_m ([S_0] + [S])}{K_m (1 + \frac{[G]}{K_{il}}) + ([S_0] + [S])}$
β-amylaza (zakupiona w BDH Ltd.) pullulanasa z <i>Aerobacter aerogenes</i>	skrobia ziemniaczana wstępnie zhydrolizowana α-amylazą [50]	wielomian piątego stopnia: $f(x) = x^5 + ax^4 + bx^3 + cx^2 + dx + e$
α-amylaza (Miles-Taka-Therm L-170) z <i>Bacillus licheniformis</i> ; glukoamylaza (Diazyme L-200)	mąka z manioku; 85 ÷ 100°C; pH 5,2 ÷ 7,0 [51]	rozszerzenie modelu kinetycznego Smith'a (1970): $\frac{dC_r}{dt} = -K \cdot (C_r)^n$
endo-β-1,4-glukanaza* exo-β-1,4-glukanaza† β-glukozydaza‡	celuloza [52]	model bazujący na kinetyce Michaelisa-Menten, uwzględniający atak losowy, inhibicje produktami końcowymi reakcji oraz występowanie trzech typów enzymów w układzie
endo-β-1,4-glukanaza z <i>Thichoderma reesei</i> exo-β-1,4-glukanaza z <i>Thichoderma reesei</i>	mikrokryształy celulozy; 40°C; pH 4,8 [53]	model zakładający prawdopodobieństwo zajścia <i>ataku fałszywego</i> P _f : $\frac{G}{G_2} = \frac{2 \cdot P_f + 1}{DP - P_f - 0,5}$
glukoamylaza z <i>Aspergillus niger</i>	skrobia ziemniaczana; 20°C, pH 5,0 [54, 55]	sztuczna sieć neuronowa
“model ogólny”	brak danych eksperymentalnych [21]	równanie multisubstratowe Michaelisa-Menten: $r_i = \frac{V_{max,i}}{K_{m,i}} \cdot C_{S_i} / \left(1 + \sum_{j=1}^N \frac{C_{S_j}}{K_{m,j}} \right), i = 1, 2, \dots, N$

* endo-β-1,4-glukan 4-glukanohydrolaza (EC 3.2.1.4)

† 1,4-β-D-glukan cellobiohydrolaza, cellobiohydrolaza, egzoglukanaza (EC 3.2.1.91)

‡ β-D-glukozydowa glukohydrolaza (EC 3.2.1.21)

2.2.6 Analityka

W pracy wykorzystano dane kinetyczne udostępnione przez panią prof. dr hab. Jolantę Bryjak opisujące proces enzymatycznej hydrolizy skrobi pod wpływem różnych enzymów amylolitycznych. Zasadniczo w prowadzonych badaniach laboratoryjnych dotyczących omawianych zagadnień, można wyróżnić trzy nurty:

- ❖ hydroliza skrobi z udziałem enzymów natywnych w reaktorach okresowych,
- ❖ hydroliza skrobi z udziałem enzymów immobilizowanych w reaktorach okresowych,
- ❖ hydroliza skrobi z udziałem enzymów immobilizowanych w reaktorach o działaniu ciągłym.

Stężenie enzymów określano spektrofotometrycznie mierząc absorpcję białka przy długości fali $\lambda=280$ nm i odczytując stężenie enzymu z wyznaczonej uprzednio krzywej wzorcowej.

Stężenie skrobi (surowca) oznaczano metodą wagową poprzez określenie masy roztworu wykorzystywanego w doświadczeniach oraz masy skrobi pozostałej po odparowaniu wody z roztworu.

Aktywność amylaz* mierzono kolorymetrycznie określając przyrost ilości cukrów zawierających koniec redukujący. Metodyka pomiaru opiera się na redukcji w środowisku kwaśnym kwasu 3,5-dinitrosalicylowego przez grupy aldehydowe lub ketonowe cukrów do kwasu 3-amino-5-nitrosalicylowego. W obecności fenolu powstaje żółtawo-brunatny kompleks, który stabilizuje się roztworem pirosiarczanu sodowego i winianu sodowo-potasowego. Stężenie cukrów redukujących oznaczane było spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda=550$ nm w oparciu o próbę kontrolną i przeliczane względem krzywej standardowej sporządzonej wcześniej dla roztworu glukozy. W dalszej części pracy opisaną metodę określania aktywności amylaz nazwano reakcją z DNS.

Pełen przekrój opisu sposobu prowadzenia doświadczeń, użytych odczynników i stosowanej analityki można znaleźć w pracach poświęconych enzymatycznej degradacji skrobi prowadzonych pod kierunkiem pani prof. dr hab. Jolanty Bryjak [54-65].

* Za jednostkę aktywności przyjęto ilość enzymu, która w warunkach testu ($T=20^{\circ}\text{C}$, czas reakcji 3 min, optymalne pH) powoduje powstanie zabarwienia adekwatnego zabarwieniu uzyskanemu dla 1 mg glukozy [54-61].

2.3 Model matematyczny enzymatycznej hydrolizy biopolimerów

2.3.1 Wprowadzenie

W niniejszym rozdziale przedstawiono założenia modelu enzymatycznej hydrolizy biopolimerów. Ze względu na dostępne dane kinetyczne pozwalające na późniejszą weryfikację modelu wybrano amylozę i amylopektynę, biopolimery wchodzące w skład skrobi, jako odpowiednio przykład polimeru liniowego i rozgałęzionego.

W celu uzyskania większej przejrzystości zdecydowano się w sposób sekwencyjny przedstawiać kolejne założenia modelu pozwalające na uwzględnienie szeregu zjawisk. Złożoność i różnorodność opisywanego zagadnienia spowodowała, iż postanowiono stworzyć iteracyjny model modułowy, w którym istnieje możliwość wyboru określonych „opcji” w zależności od opisywanego procesu i danych jakimi dysponujemy. W pracy starano się położyć większy nacisk na przedstawienie głównych idei opracowanego modelu, niż na szczegółowe omówienie wszystkich opisywanych w rozdziale zagadnień. W zamierzeniu autora, powinno to umożliwić czytelnikowi łatwiejszą adaptację opracowanego modelu do opisu konkretnego procesu enzymatycznego.

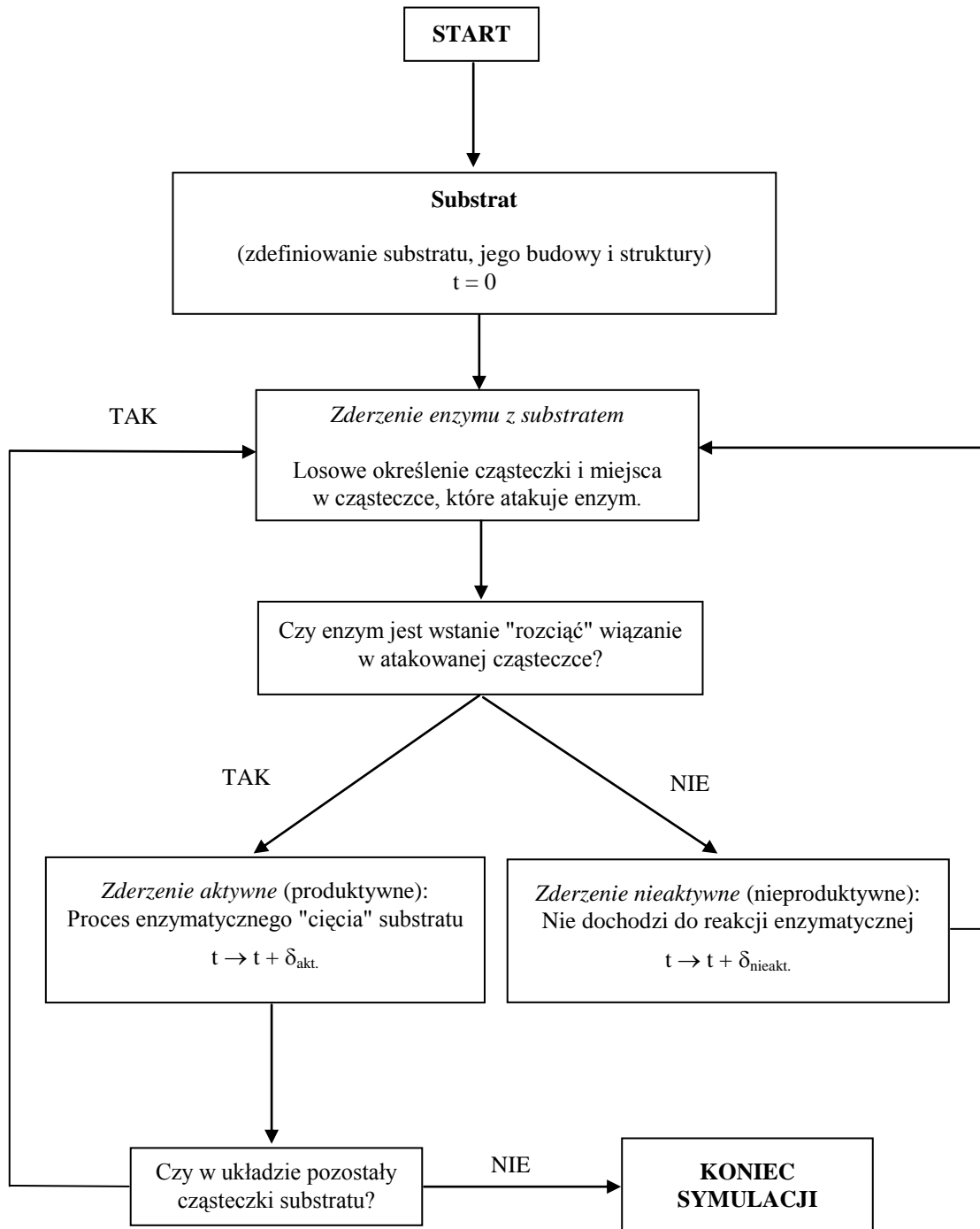
Przy opracowaniu modelu kinetycznego bazowano na teorii zderzeń, zakładającej że w środowisku reakcji dochodzi do nieustannych zderzeń między indywiduami mieszaniny reakcyjnej, a opisywane w pracy reakcje enzymatyczne są wynikiem zderzeń cząsteczek enzymów z cząsteczkami substratów. Ogólny model takiego procesu przedstawiono na sąsiedniej stronie. W pierwszej części niniejszego rozdziału, założono, że mamy do czynienia jedynie z dwoma typami zderzeń:

⇒ *zderzeniem aktywnym (produktywnym)*- w wyniku którego dochodzi do właściwego procesu katalizy enzymatycznej, składającego się z szeregu etapów fizycznych (wiązanie substratu z enzymem, uwalnianie produktu z centrum aktywnego enzymu) i etapów chemicznych [19],

⇒ *zderzeń nieaktywnych (nieproduktywnym)* - w wyniku których nie dochodzi do reakcji enzymatycznej.

W kolejnych podrozdziałach przedstawiono wybrane zagadnienie związane z modelowaniem reakcji enzymatycznych.

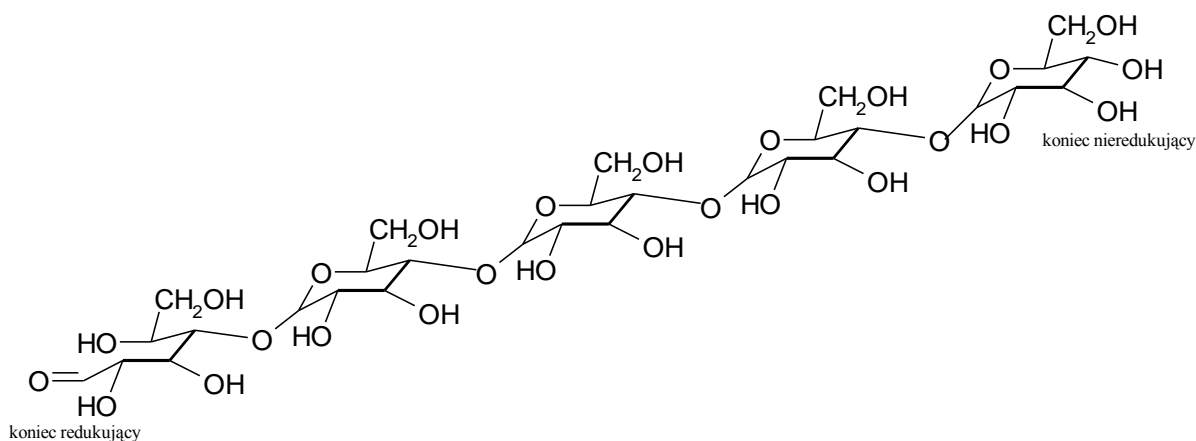
Schemat ogólny reakcji enzymatycznej zachodzącej według teorii zderzeń.



2.3.2 Model hydrolizy amylopektyny

2.3.2.1 Zdefiniowanie amylozy

Jak wspomniano, amyloza jest polimerem liniowym złożonym z reszt D-glukozy powiązanych wiązaniem glikozydowym α -1 \rightarrow 4. Cząsteczka amylozy posiada dwa końce różniące się właściwościami chemicznymi; *koniec nieredukujący* i *koniec redukujący* (z wolną grupą aldehydową). Stosowana analityka opiera się na metodzie z DNS [54-63], pozwalającej na określenie ilości cukrów, które zawierają wolną grupę aldehydową lub ketonową. Innymi słowy, w wyniku pomiarów, otrzymujemy informację o ilości końców redukujących, która to ilość nie zależy od długości łańcuchów polocukrowych amylozy, lecz jedynie od ich ilości w opisywanym układzie.



Rys. 2.1. Schemat cząsteczki amylozy. Na rysunku zaznaczono pięć podjednostek glukozy, w rzeczywistości dla amylozy wchodzącej w skład skrobi ziemniaczanej liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylozy waha się od 1000 do 6000.

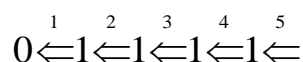
W dalszej części pracy przyjęto, że dla uproszczenia podjednostki glukozy w cząsteczce amylozy będzie przedstawiana symbolicznie jako strzałki. W celu odróżnienia od znaków powszechnie przyjętych w notacji chemicznej, przyjęto że dla wyróżnienia podjednostki glukozy będą oznaczane jako *strzałki z podwójnym beltem*: " \Rightarrow ". Wybrano arbitralnie, że zwrot strzałek będzie odpowiadał zapisowi wiązania α -1 \rightarrow 4 i będzie on zgodny z kierunkiem degradacji cząsteczki w przypadku działania β - i glukoamylazy. Przy numerowaniu podjednostek glukozy, przyjęto numerację od końca redukującego w kierunku końca nieredukującego, zaznaczając numer jej nad strzałką symbolizującą podjednostkę glukozy. Ze względu na stosowaną w części doświadczalnej analitykę, postanowiono stworzyć funkcję charakterystyczną opisującą wszystkie wolne końce

redukujące oraz końce redukujące mogące powstać w wyniku całkowitej degradacji cząsteczek polocukrów do wolnej glukozy.

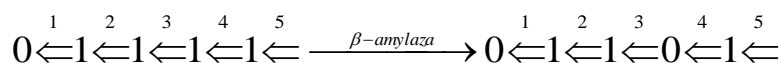
Funkcja charakterystyczna A opisująca ilość wolnych końców redukujących i ilość wiązań glikozydowych α -1 \rightarrow 4 została zdefiniowana następująco:

1. Każdej podjednostce glukozy n , zostaje przypisana wartość binarna zero lub jeden, określająca "Czy podjednostka lub cząsteczka glukozy występuje potencjalnie w formie aldehydowej?": $A \in (0,1)$.
2. Wartość zero przyjmuje funkcja dla danej podjednostki lub cząsteczki glukozy, jeśli zawiera ona wolną grupę aldehydową (koniec redukujący): $A_n = 0$.
3. Wartość jeden przyjmuje funkcja dla danej podjednostki glukozy, jeżeli jej pierwszy atom węgla uczestniczy w wiązaniu α -1 \rightarrow 4 z kolejną podjednostką glukozy: $A_n = 1$.

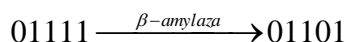
Przyjęto, że w schematycznym opisie cząsteczki amylozy, wartość opisanej powyżej funkcji charakterystycznej będzie zapisywana dla danej podjednostki lub cząsteczki glukozy w miejscu wskazanym przez grot strzałki symbolizującej podjednostkę glukozy. Według przyjętych zasad, cząsteczkę amylozy złożoną z pięciu podjednostek glukozy można przedstawić symbolicznie jako:



Przykładowo, hydrolizę powyższej cząsteczki przy udziale β -amylazy do maltotriozy i maltozy można zapisać następująco:



Dzięki wprowadzeniu funkcji charakterystycznej, łatwo zauważyć, że w wyniku powyższej reakcji, liczba końców redukujących w układzie wzrosła o jeden, a ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 zmalała o jeden, przy niezminionej liczbie podjednostek glukozy w rozpatrywanym układzie. W przypadku amylozy, w oparciu o zaproponowaną funkcję charakterystyczną, można sprowadzić zapis reakcji do zapisu binarnego. Przykładowo omawianą powyżej reakcję można zapisać jako:



2.3.2.2 Opis cząsteczek substratów i produktów reakcji.

1. Amyloza:

- 1.1. polimer liniowy złożony z podjednostek glukozy. W przypadku skrobi ziemniaczanej przyjmuje się ze ilość podjednostek glukozy wchodzących w skład amyloz tworzących ziarna skrobi ziemniaczanej waha się od 1000 do 6000 podjednostek glukozy: $1000 \leq l_{g_{am}} \leq 6000$,
- 1.2. liczba wiązań α -1 \rightarrow 4 między cząsteczkami glukozy w amylozie: $w_{am} = l_{g_{am}} - 1$,
- 1.3. ze względu na charakter reakcji przyjęto, że wiązania α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylozy będą numerowane od końca redukującego,
- 1.4. cząsteczka amylopektyny posiada dwa końce rozróżnialne w stosowanej analityce: koniec redukujący i nieredukujący.

2. Produkty końcowe:

- 2.1. glukoza ($l_g = 1$),
- 2.2. maltoza - zawiera dwie podjednostki glukozy ($l_g = 2$),
- 2.3. maltotrioza - zawiera trzy podjednostki glukozy ($l_g = 3$).

2.3.2.3 Ogólne założenia modelu hydrolizy amylozy.

W oparciu o zaproponowany w pracy model, możliwe jest symulowanie reakcji enzym - jedna cząsteczka amylozy lub enzym - wiele cząsteczek amylozy. Możliwe jest także narzucenie określonej długości cząsteczki amylozy lub przyjęcie pseudolosowego rozkładu ich długości. Średnia długość cząsteczek amylozy waha się od 1000 do 6000 podjednostek glukozy w zależności od jej pochodzenia, sposobu otrzymania i składowania [5, 6]. W pracy przyjęto, że niezależnie od długości i ilości cząsteczek, będą one zapisywane w formie jednego łańcucha binarnego. Przykładowo, trzy cząsteczki amylozy o długości po 4000 podjednostek glukozy, można przedstawić symbolicznie jako:

$$0 \leftarrow 1 \leftarrow 1 \dots 1 \leftarrow 1 \leftarrow ; 0 \leftarrow 1 \leftarrow 1 \dots 1 \leftarrow 1 \leftarrow ; 0 \leftarrow 1 \leftarrow 1 \dots 1 \leftarrow 1 \leftarrow ,$$

co odpowiada, przy przyjętej notacji binarnej, zapisowi:

$$011\dots11 \ 011\dots11 \ 011\dots11.$$

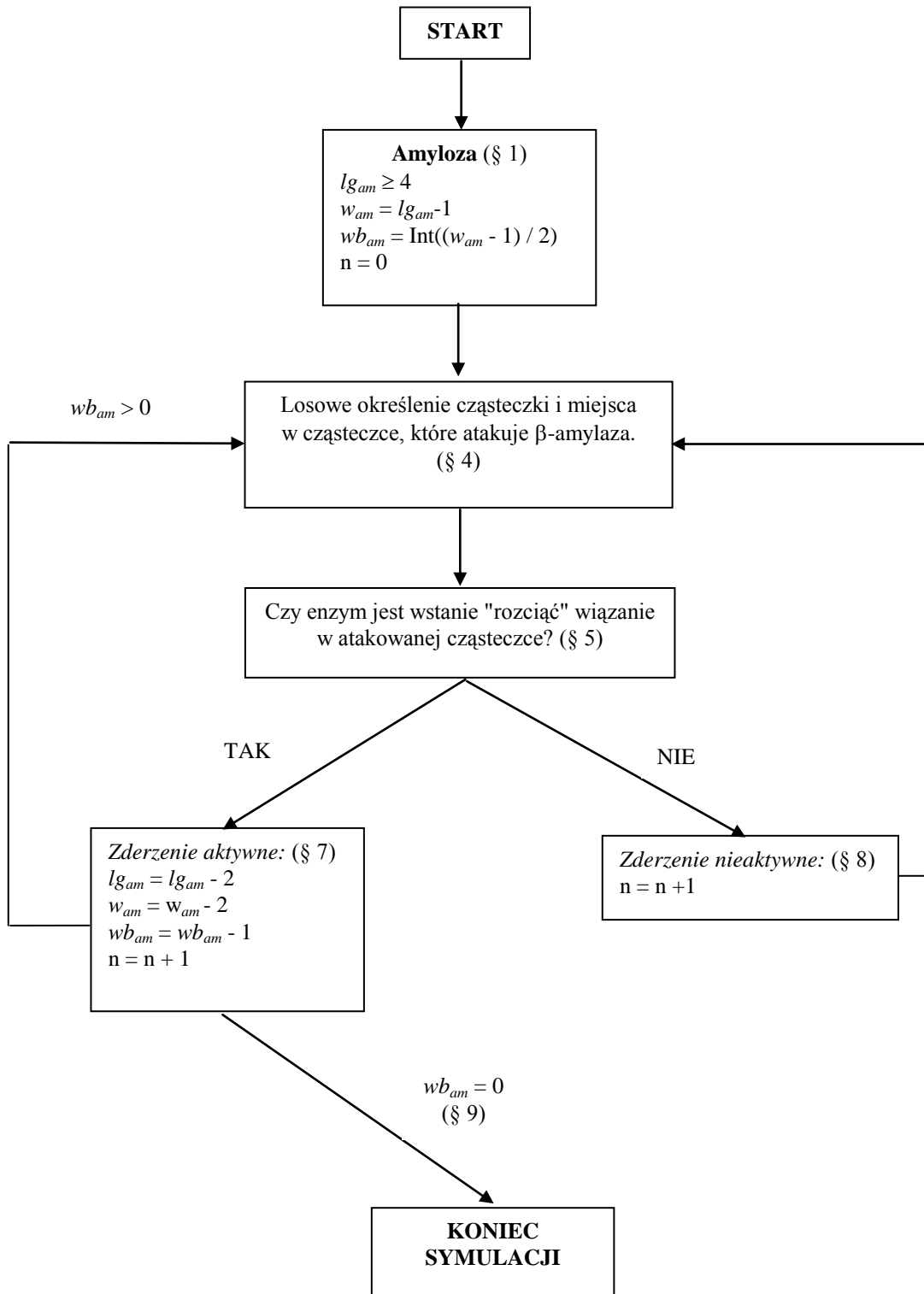
Określenie cząsteczki i miejsca ataku enzymu, odbywa się poprzez wygenerowanie liczby całkowitej (w opisywanym przykładzie będzie to liczba całkowita z przedziału $1 \div 12000$), która jednoznacznie określa daną podjednostkę glukozy oraz jej położenie w łańcuchu polocukrowym. Następnie, zgodnie ze specyfiką enzymu, zostaje określone, w sposób opisany w dalszej części pracy, czy enzym jest w stanie zhydrolizować cząsteczkę w danym miejscu?

2.3.2.4 Hydroliza amylozy przy udziale β -amylazy.

1. Częsteczkami substratów są cząsteczki amylozy, ($lg_{am} \geq 4$) oraz ($w_{am} \geq 3$).
Dla amylozy ze skrobi ziemniaczanej przyjmuje się $lg_{am} \sim 4000$.
Liczba rozpatrywanych cząsteczek substratu w modelu jest nieograniczona.
2. Końcowymi produktami reakcji są cząsteczki maltozy i maltotriozy.
3. Symulacja reakcji odbywa się w oparciu o losowe określenie miejsca ataku enzymu na cząsteczki zawarte w roztworze. W sposób losowy określana jest liczba z przedziału $1 \div lg_{calc}$, która w jednoznaczny sposób określa podjednostkę glukozy wraz cząsteczkę cukru w której się zawiera oraz wiązanie przy węglu C₁ w danej podjednostce.
4. Rozpatrywane są dwa typy zderzeń:
 - 4.1. *aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę amylozy, w miejscu podatnym na działanie enzymu,
 - 4.2. *nieaktywne* - kiedy enzym, atakuje cząsteczkę amylozy w miejscu niepodatnym na działanie β -amylazy lub enzym atakuje inną cząsteczkę.
5. Miejscem podatnym na działanie β -amylazy jest wiązanie α -1 \rightarrow 4 między drugą i trzecią podjednostką glukozy w cząsteczce amylozy, licząc od końca nieredukującego wiązanie podatne na atak β -amylazy posiada numer ($w_{am} - 2$).
6. Ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylozy potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy wynosi: $wb_{am} = \text{Int}((w_{am} - 1) / 2)$.
7. W wyniku zderzenia aktywnego, od końca nieredukującego odcinana jest cząsteczka maltozy:
 - 7.1. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylozy maleje o dwie: $[lg_{am}]_n \Rightarrow [lg_{am} - 2]_{n+1}$,
 - 7.2. ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylozy maleje o dwa: $[w_{am}]_n \Rightarrow [w_{am} - 2]_{n+1}$,
 - 7.3. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
8. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 8.1. liczba cząsteczek w układzie pozostaje bez zmian,
 - 8.2. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylozy pozostaje bez zmian: $[lg_{am}]_n \Rightarrow [lg_{am}]_{n+1}$,
 - 8.3. ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylozy pozostaje bez zmian: $[w_{am}]_n \Rightarrow [w_{am}]_{n+1}$,
 - 8.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
9. Za koniec reakcji przyjmuje się najmniejszą iterację, dla której ilość wiązań α -1 \rightarrow 4, w cząsteczkach amylozy, potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy wynosi zero: $wb_{am} = 0$.
10. Miarą postępu reakcji jest ilość końców redukujących uwalnianych podczas procesu hydrolizy amylozy przez β -amylazę.

Na sąsiedniej stronie przedstawiono schemat blokowy hydrolizy amylozy przy udziale β -amylazy. Symbolem *paragraf* - "\$" zaznaczono na schemacie blokowym odnośniki do powyższego tekstu.

Hydroliza amylozy przy udziale β -amylazy - schemat blokowy.

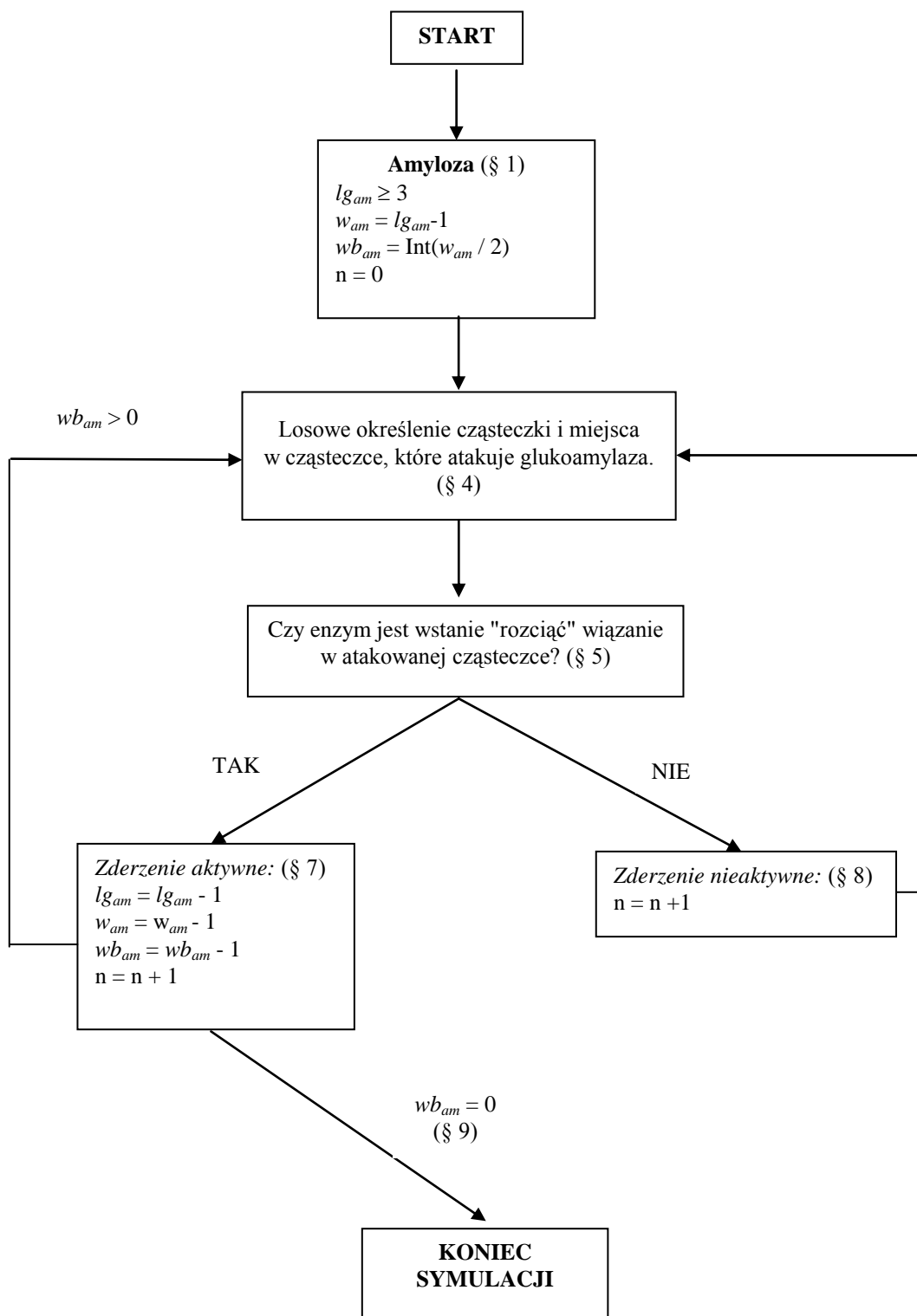


2.3.2.5 Hydroliza amylozy przy udziale glukoamylazy (γ -amylazy).

1. Częsteczkami substratów są cząsteczki amylozy, ($lg_{am} \geq 3$) oraz ($w_{am} \geq 2$).
Dla amylozy ze skrobi ziemniaczanej przyjmuje się $lg_{am} \sim 4000$.
Liczba rozpatrywanych cząsteczek substratu w modelu jest nieograniczona.
2. Końcowymi produktami reakcji są cząsteczki glukozy i maltozy.
3. Symulacja reakcji odbywa się w oparciu o losowe określenie miejsca ataku enzymu na cząsteczki zawarte w roztworze. W sposób losowy określana jest liczba z przedziału $1 \div lg_{catk}$, która w jednoznaczny sposób określa podjednostkę glukozy wraz cząsteczkę cukru w której się zawiera oraz wiązanie przy węglu C₁ w danej podjednostce.
4. Rozpatrywane są dwa typy zderzeń:
 - 4.1. *aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę amylozy, w miejscu podatnym na działanie enzymu,
 - 4.2. *nieaktywne* - kiedy enzym, atakuje cząsteczkę amylozy w miejscu niepodatnym na działanie glukoamylazy lub enzym atakuje inną cząsteczkę.
5. Miejscem podatnym na działanie glukoamylazy jest wiązanie α -1 \rightarrow 4 między pierwszą i drugą podjednostką glukozy w cząsteczce amylozy licząc od końca nieredukującego, wiązanie podatne na atak β -amylazy posiada numer ($w_{am} - 1$).
6. Ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylozy potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy wynosi: $wb_{am} = \text{Int}(w_{am} / 2)$.
7. W wyniku zderzenia aktywnego, od końca nieredukującego odcinana jest cząsteczka glukozy:
 - 7.1. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylozy maleje o jedną: $[lg_{am}]_n \Rightarrow [lg_{am} - 1]_{n+1}$,
 - 7.2. ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylozy maleje o jedno: $[w_{am}]_n \Rightarrow [w_{am} - 1]_{n+1}$,
 - 7.3. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
8. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 8.1. liczba cząsteczek w układzie pozostaje bez zmian,
 - 8.2. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylozy pozostaje bez zmian: $[lg_{am}]_n \Rightarrow [lg_{am}]_{n+1}$,
 - 8.3. ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylozy pozostaje bez zmian: $[w_{am}]_n \Rightarrow [w_{am}]_{n+1}$,
 - 8.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
9. Za koniec reakcji przyjmuje się najmniejszą iterację, dla której ilość wiązań α -1 \rightarrow 4, w cząsteczkach amylozy, potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania glukoamylazy wynosi zero: $wb_{am} = 0$.
10. Miarą postępu reakcji jest ilość końców redukujących uwalnianych podczas procesu hydrolizy amylozy przez glukoamylazę.

Na sąsiedniej stronie przedstawiono schemat blokowy hydrolizy amylozy przy udziale glukoamylazy. Symbolem *paragraf* - "\$" zaznaczono na schemacie blokowym odnośniki do powyższego tekstu.

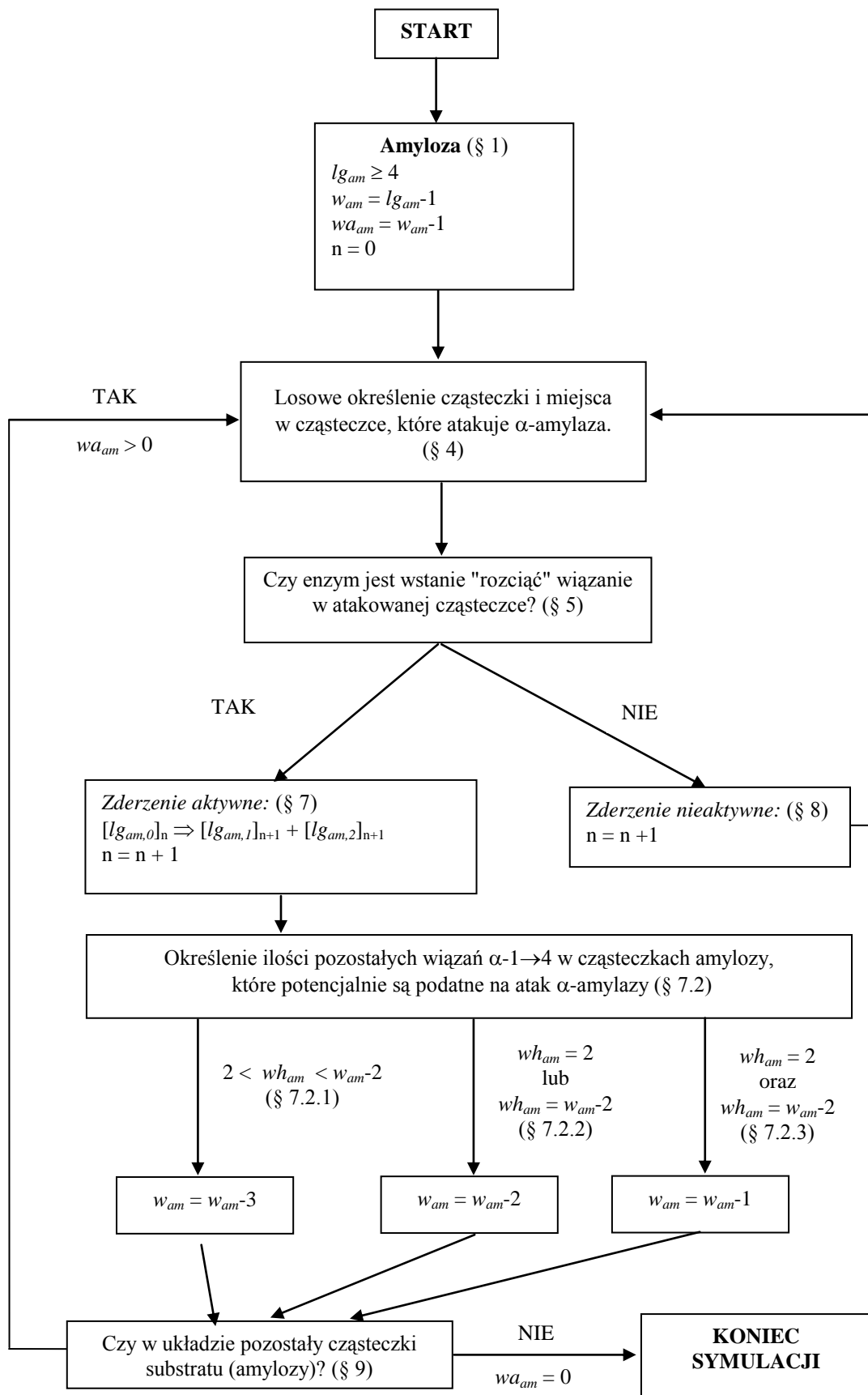
Hydroliza amylozy przy udziale glukoamylazy - schemat blokowy.



2.3.2.6 Hydroliza amylozy przy udziale α -amylazy.

1. Częsteczkami substratów są cząsteczki amylozy, ($lg_{am} \geq 4$) oraz ($w_{am} \geq 3$).
Dla amylozy ze skrobi ziemniaczanej przyjmuje się $lg_{am} \sim 4000$.
Liczba rozpatrywanych cząsteczek substratu w modelu jest nieograniczona.
2. Końcowymi produktami reakcji są cząsteczki maltozy i maltotriozy.
3. Symulacja reakcji odbywa się w oparciu o losowe określenie miejsca ataku enzymu na cząsteczki zawarte w roztworze. W sposób losowy określana jest liczba z przedziału $1 \div lg_{calk}$, która w jednoznaczny sposób określa podjednostkę glukozy wraz cząsteczkę cukru w której się zawiera oraz wiązanie przy węglu C₁ w danej podjednostce.
4. Rozpatrywane są dwa typy zderzeń:
 - 4.1. *aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę amylozy, w miejscu podatnym na działanie enzymu,
 - 4.2. *nieaktywne* - kiedy enzym, atakuje cząsteczkę amylozy w miejscu niepodatnym na działanie α -amylazy lub enzym atakuje inną cząsteczkę.
5. Miejscem podatnym na działanie α -amylazy są wiązania α -1 \rightarrow 4 wewnątrz łańcucha poliglukozowego amylozy. Wiązanie hydrolizowane przez α -amylazę w cząsteczce amylozy musi być co najmniej oddalone o dwie reszty glukozy od końca redukującego i o dwie reszty glukozy od końca nieredukującego: $2 \leq wh_{am} \leq (w_{am} - 2)$.
6. Ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylozy, które potencjalnie są podatne na atak α -amylazy wynosi: $wa_{am} = w_{am} - 2$.
7. W wyniku zderzenia aktywnego, cząsteczka amylozy rozcinana jest na dwa polocukry:
 - 7.1. suma ilości podjednostek glukozy w obu powstałych polocukrach odpowiada ilości podjednostek glukozy w wyjściowej cząsteczce amylozy: $[lg_{am,0}]_n \Rightarrow [lg_{am,1}]_{n+1} + [lg_{am,2}]_{n+1}$,
 - 7.2. suma dostępnych dla α -amylazy wiązań α -1 \rightarrow 4 w powstałych cząsteczkach polocukrów, maleje w stosunku do wyjściowej cząsteczki amylozy o:
 - 7.2.1. 3 wiązania: $[wh_{am}]_n = [wh_{am} - 3]_{n+1}$, gdy: $2 < wh_{am} < (w_{am} - 2)$
(np. 011111111111 $\xrightarrow{\alpha\text{-amylaza}}$ 011111+011111),
 - 7.2.2. 2 wiązania: $[wh_{am}]_n = [wh_{am} - 2]_{n+1}$, gdy: $wh_{am} = 2$ lub $wh_{am} = (w_{am} - 2)$
(np. 01111111 $\xrightarrow{\alpha\text{-amylaza}}$ 01+011111 lub 01111111 $\xrightarrow{\alpha\text{-amylaza}}$ 011111+01),
 - 7.2.3. 1 wiązanie: $[wh_{am}]_n = [wh_{am} - 1]_{n+1}$, gdy $wh_{am} = 2$ oraz $wh_{am} = (w_{am} - 2)$
(0111 $\xrightarrow{\alpha\text{-amylaza}}$ 01+01),
 - 7.3. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
8. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 8.1. liczba cząsteczek w układzie pozostaje bez zmian,
 - 8.2. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylozy pozostaje bez zmian: $[lg_{am}]_n \Rightarrow [lg_{am}]_{n+1}$,
 - 8.3. ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylozy pozostaje bez zmian: $[w_{am}]_n \Rightarrow [w_{am}]_{n+1}$,
 - 8.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
9. Za koniec reakcji przyjmuje się najmniejszą iterację, dla której ilość wiązań α -1 \rightarrow 4, w cząsteczkach amylozy, potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania α -amylazy wynosi zero: $wa_{am} = 0$.
10. Miarą postępu reakcji jest ilość końców redukujących uwalnianych podczas procesu hydrolizy amylozy przez α -amylazę.

Na sąsiedniej stronie przedstawiono schemat blokowy hydrolizy amylozy przy udziale α -amylazy. Symbolem *paragraf* - "\$" zaznaczono na schemacie blokowym odnośniki do powyższego tekstu.

Hydrolyza amylozy przy udziale α -amylazy - schemat blokowy.

2.3.3 Hydroliza skrobi

W dalszej części pracy przedstawiony model hydrolizy skrobi, rozszerzając prezentowany model hydrolizy cząsteczek liniowych (amylozy) o opis cząsteczek rozgałęzionych (amylopektyny).

2.3.3.1 Opis amylopektyny

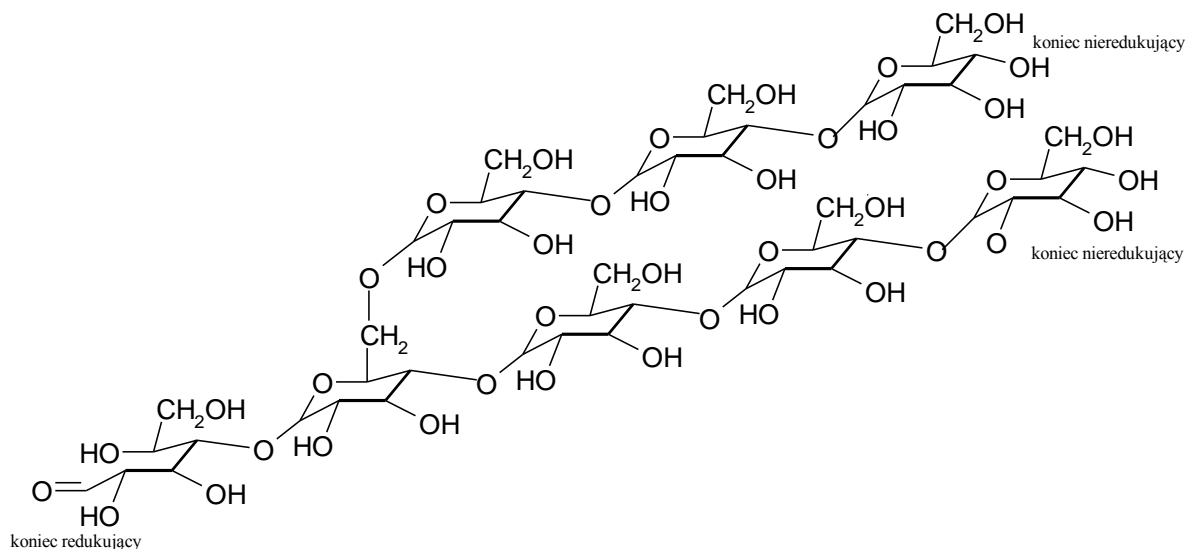
Amylopektyna jest polimerem rozgałęzionym, zawierającym w porównaniu z amylozą, pewną ilość dodatkowych wiązań α -1 \rightarrow 6 glikozydowych. Statystycznie stosunek wiązań α -1 \rightarrow 4 do wiązań α -1 \rightarrow 6 w cząsteczce amylopektyny wchodzącej w skład ziarna skrobi ziemniaczanej wynosi 20 : 1. Strukturalnie cząsteczka amylopektyny przypomina swą budową drzewo, którego konar zakończony jest wiązaniem redukującym, natomiast gałęzie wiązaniami nieredukującymi. W cząsteczce amylopektyny rozróżniamy trzy typy łańcuchów* :

- *łańcuch C* - składa się z podjednostek glukozy powiązanych wyłącznie wiązaniami typu α -1 \rightarrow 4 i zawiera jeden wolny koniec nieredukujący i jedyny w cząsteczce amylopektyny wolny koniec redukujący. Obrazowo można przedstawić łańcuch C jako pień drzewa.
- *łańcuchy B* - składają się z podjednostek glukozy powiązanych wiązaniami typu α -1 \rightarrow 4. Poprzez wiązanie glikozydowe α -1 \rightarrow 6 są one przyłączone do łańcucha C. W strukturze drzewa odpowiadają one konarom.
- *łańcuchy A* - są krótkimi łańcuchami zawierającymi od 10 do 30 podjednostek glukozy powiązanych wiązaniami typu α -1 \rightarrow 4. Poprzez wiązania glikozydowe α -1 \rightarrow 6 są one przyłączone do łańcuchów B lub C. W stosowanej analogii do drzewa, łańcuchy A odpowiadają gałęziom.

Jak wynika z powyższego opisu, cząsteczka amylopektyny posiada jeden koniec redukujący (oznaczany w reakcji z DNS) i szereg końców nieredukujących. Liczba końców nieredukujących odpowiada sumie ilości łańcuchów A, B i C w cząsteczce amylopektyny. W pracy dodatkowo przyjęto rozróżnienie na łańcuchów na podrzędne i nadrzędne, przyjmując następującą definicję: „łańcuch poliglukozowy *X* jest podrzędny względem łańcucha *Y*, jeżeli jest on przyłączony poprzez wiązanie α -1 \rightarrow 6 do łańcucha *Y*; tym samym łańcuch *Y* jest nadrzędny wobec łańcucha *X*”. Za miejsce (punkt) rozgałęzienia przyjęto

* Istnieje także inny model budowy cząsteczki amylopektyny, wyróżniający tylko łańcuchy A i B. Zakłada on, że amylopektynę zbudowana jest z szeregu krótkich łańcuchów A, zawierających od 10 do 20 podjednostek

podjednostkę glukozy w łańcuchu nadrzędnym bezpośrednio do której poprzez wiązanie α -1 \rightarrow 6 przyłączony jest łańcuch podrzędny. Wprowadzenie tych pojęć jest szczególnie użyteczne przy analizowaniu struktury cząsteczki amylopektyny i sposobu jej degradacji.



Rys. 2.2. Schemat cząsteczki amylopektyny. Na rysunku zaznaczono osiem podjednostek glukozy (5 w łańcuchu nadrzędnym i 4 w łańcuchu podrzędnym), w rzeczywistości dla amylopektyny wchodzącej w skład skrobi ziemniaczanej liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylopektyny waha się od 15000 do 100000.

W celu zachowania zgodności z zaproponowanym wcześniej sposobem oznaczania schematycznych cząsteczek amylozy, przyjęto że podjednostki glukozy przyłączone poprzez wiązanie glikozydowe α -1 \rightarrow 6, będą przedstawiane jako *strzałki z podwójnym beltem skierowane w dół*: " \Downarrow ". Grot strzałki wskazuje na podjednostkę glukozy w łańcuchu nadrzędnym do której, poprzez wiązanie glikozydowe α -1 \rightarrow 6 przyłączony jest łańcuch podrzędny. Przy numerowaniu podjednostek glukozy, przyjęto że podjednostkom glukozy będą nadawane numery począwszy od końca redukującego w kierunku końca nieredukującego, zaznaczając numer jej nad strzałką symbolizującą podjednostkę glukozy. Numerowane są kolejno podjednostki glukozy w łańcuchu „głównym”: C, następnie numerowane są podjednostki w łańcuchu B, który jest najbliżej końca redukującego łańcucha A. W następnym etapie numerowane są kolejno podjednostki glukozy w łańcuchach podrzędnych względem łańcucha B, poczynając od miejsca ich przyłączenia określanych przez

glukozy związanych wiązaniami α -1 \rightarrow 4 glikozydowymi, które są przyłączone poprzez wiązania α -1 \rightarrow 6 do dłuższych łańcuchów B. Stosunek ilości łańcuchów B do łańcuchów A wynosi od 1:4 do 1:9.

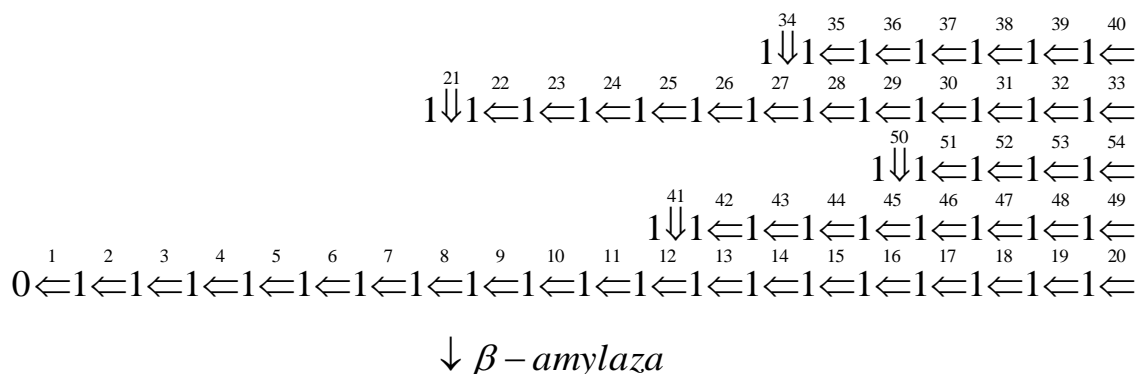
2. Wartość zero przyjmuje funkcja dla danej podjednostki lub cząsteczki glukozy, jeśli zawiera ona wolną grupę aldehydową (jest "końcem redukującym"): $A_n = 0$.
3. Wartość jeden przyjmuje funkcja dla danej podjednostki glukozy, jeżeli jej pierwszy atom węgla uczestniczy w wiązaniu α -1 \rightarrow 4 lub α -1 \rightarrow 6 z kolejną podjednostką glukozy: $A_n = 1$.

Funkcję opisującą rozgałęzienia B , w cząsteczce amylopektyny zdefiniowano następująco:

1. Wartości funkcji opisująca rozgałęzienia B zawierają się w zbiorze liczb naturalnych z włączeniem wartości zero: $B \in (N + 0)$.
2. Funkcja przyjmuje wartość zero dla danej n -tej podjednostki glukozy, jeżeli zawarty w niej atom węgla C_1 nie uczestniczy w wiązaniu z następną podjednostką glukozy (koniec redukujący) lub jest powiązany wiązaniem α -1 \rightarrow 4 z poprzedzającą go podjednostką glukozy: $B_n = 0$.
3. Funkcja przyjmuje wartość dodatnią dla danej podjednostki glukozy, jeżeli poprzez zawarty w niej atom węgla C_6 jest do niej przyłączony łańcuch podrzędny w stosunku do łańcucha, w którym znajduje się dana podjednostka glukozy. Wartość funkcji przypisywany jest numer nadany podjednostce glukozy zawartej w łańcuchu podrzędnym, z którą tworzy ona wiązanie α -1 \rightarrow 6 (punkt rozgałęzienia): $B_n = n$.

W dalszej części pracy funkcję B nazwano *funkcją rozgałęzień*.

Założmy, że wspomniana w poprzednim przykładzie cząsteczka amylopektyny, ulega najpierw atakowi β -amylazy na wiązanie między podjednostkami glukozy 18 i 19 w łańcuchu C, a następnie pojedynczemu atakowi α -amylazy na wiązanie pomiędzy podjednostkami 23 i 24 w łańcuchu B₁. Schematycznie możemy ten proces przedstawić następująco:



Tak, więc, w oparciu o przedstawiony schemat, każdej podjednostce glukozy przyporządkowana została para liczb. Jak wcześniej napisano:

- ❖ Pierwsza liczba - odpowiada funkcji charakterystycznej, określającej ilość wolnych końców redukujących (wartość zero) i ilość końców redukujących mogących być potencjalnie uwolnionych (wartość jeden).
- ❖ Druga liczba określa strukturę rozgałęzionej cząsteczki. Przyjmuje wartość dodatnią dla danej podjednostki w łańcuchu nadrzędnym, gdy bezpośrednio do niej przyłączony jest łańcuch podrzędny. Wartość ujemną przyjmuje dla danej podjednostki w łańcuchu podrzędym, gdy poprzez wiązanie α -1 \rightarrow 6 jest bezpośrednio przyłączona do łańcucha nadrzędnego. Wartość zero sygnalizuje brak rozgałęzienia przy danej podjednostce, czyli w cząsteczce amylozy wartości wszystkich drugich parametrów wynoszą zero.

W opracowanym modelu miarą postępu reakcji jest binarna funkcja charakterystyczna (pierwsza liczba). Zmiana jej wartości z jeden na zero odpowiada uwalnianiu się w wyniku hydrolizy enzymatycznej końców redukujących.

2.3.3.2 Hydroliza amylopektyny przy udziale enzymów amylolytycznych

Proces enzymatycznej hydrolizy amylopektyny zdefiniowano w sposób analogiczny do opisanego wcześniej procesu hydrolizy amylozy. Najistotniejszą różnicą między modelami dla amylozy i amylopektyny jest konieczność uwzględnienia rozgałęzień w amylopektynie. Drugą różnicą jest, zaproponowanie wyznaczania w sposób rekurencyjny ilości wiązań w cząsteczce amylopektyny podatnych na hydrolizę określonymi enzymami. Wynika to z faktu, iż cząsteczki amylopektynie o tej samej liczbie podjednostek glukozy i tej samej ilości rozgałęzień, mogą mieć różną liczbę miejsc podatnych na enzymatyczną hydrolizę.

2.3.3.3 Hydroliza amylopektyny przy udziale β -amylazy.

1. Częsteczkami substratów są cząsteczki amylopektyny.
Dla amylopektyny ze skrobi ziemniaczanej przyjmuje się $lg_{ap} \sim 15000 \div 100000$.
Liczba rozpatrywanych cząsteczek substratu w modelu jest nieograniczona.
2. Końcowymi produktami reakcji są cząsteczki maltozy, maltotriozy i dekstryn granicznych.
3. Symulacja reakcji odbywa się w oparciu o losowe określenie miejsca ataku enzymu na cząsteczki zawarte w roztworze. W sposób losowy określana jest liczba z przedziału $1 \div lg_{calc}$, która w jednoznaczny sposób określa podjednostkę glukozy wraz cząsteczkę cukru w której się zawiera oraz wiązanie przy węglu C₁ w danej podjednostce.
4. Rozpatrywane są dwa typy zderzeń:
 - 4.1. *aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę amylopektyny, w miejscu podatnym na działanie enzymu,
 - 4.2. *nieaktywne* - kiedy enzym, atakuje cząsteczkę amylopektyny w miejscu niepodatnym na działanie β -amylazy lub enzym atakuje cząsteczkę produktu.
5. Miejscem podatnym na działanie β -amylazy są wiązania α -1 \rightarrow 4 między drugą i trzecią podjednostką glukozy w łańcuchu A, B lub C cząsteczki amylopektyny, licząc od końca nieredukującego. Hydrolizowane wiązanie musi być oddalone co najmniej o trzy podjednostki, licząc od punktu rozgałęzienia.
6. Ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylopektyny potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy wynosi:

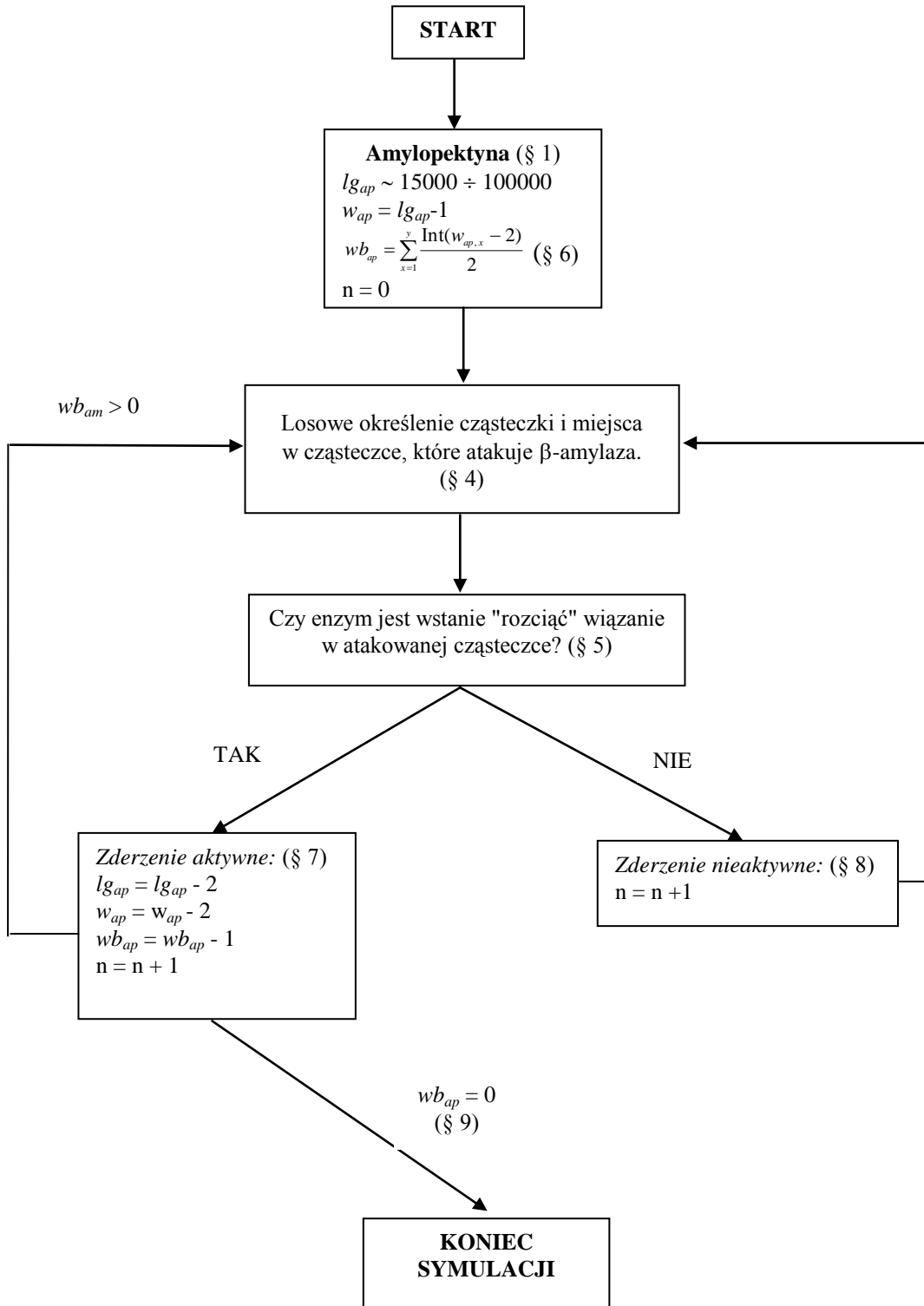
$$wb_{ap} = \sum_{x=1}^y \frac{\text{Int}(w_{ap,x} - 2)}{2},$$

gdzie y jest ilością łańcuchów w cząsteczce amylopektyny, a x ilością podjednostek glukozy w danym łańcuchu licząc od końca nieredukującego do pierwszego miejsca rozgałęzienia.

7. W wyniku zderzenia aktywnego, od końca nieredukującego odcinana jest cząsteczka maltozy:
 - 7.1. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylopektyny maleje o dwie: $[lg_{ap}]_n \Rightarrow [lg_{ap} - 2]_{n+1}$,
 - 7.2. ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylopektyny maleje o dwa: $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap} - 2]_{n+1}$,
 - 7.3. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
8. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 8.1. liczba cząsteczek w układzie pozostaje bez zmian,
 - 8.2. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylopektyny pozostaje bez zmian: $[lg_{ap}]_n \Rightarrow [lg_{ap}]_{n+1}$,
 - 8.3. ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylopektyny pozostaje bez zmian: $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap}]_{n+1}$,
 - 8.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
9. Za koniec reakcji przyjmuje się najmniejszą iterację, dla której ilość wiązań α -1 \rightarrow 4, w cząsteczkach amylopektyny, potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy wynosi zero: $wb_{ap} = 0$.
10. Miarą postępu reakcji jest ilość końców redukujących uwalnianych podczas procesu hydrolizy amylopektyny przez β -amylazę.

Na sąsiedniej stronie przedstawiono schemat blokowy hydrolizy amylopektyny przy udziale β -amylazy. Symbolem *paragraf* - "\$" zaznaczono na schemacie blokowym odnośniki do powyższego tekstu.

Hydroliza amylopektyny przy udziale β -amylazy - schemat blokowy.



2.3.3.4 Hydroliza amylopektyny przy udziale glukoamylazy (γ -amylazy).

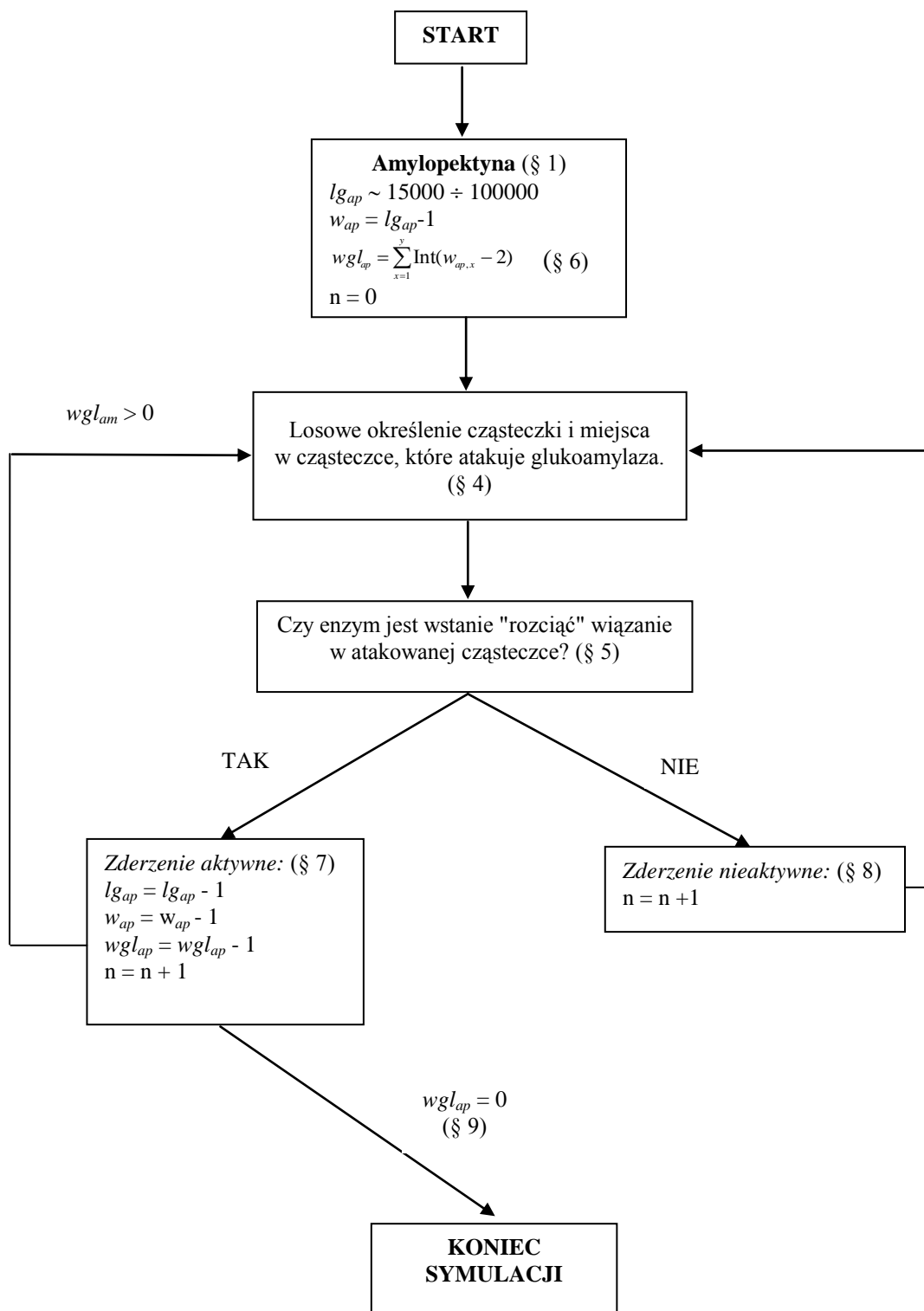
1. Częsteczkami substratów są cząsteczki amylopektyny.
Dla amylopektyny ze skrobi ziemniaczanej przyjmuje się $lg_{ap} \sim 15000 \div 100000$.
Liczba rozpatrywanych cząsteczek substratu w modelu jest nieograniczona.
2. Końcowymi produktami reakcji są cząsteczki glukozy, maltozy i dekstryn granicznych.
3. Symulacja reakcji odbywa się w oparciu o losowe określenie miejsca ataku enzymu na cząsteczki zawarte w roztworze. W sposób losowy określana jest liczba z przedziału $1 \div lg_{catk}$, która w jednoznaczny sposób określa podjednostkę glukozy wraz cząsteczkę cukru w której się zawiera oraz wiązanie przy węglu C_1 w danej podjednostce.
4. Rozpatrywane są dwa typy zderzeń:
 - 4.1. *aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę amylopektyny, w miejscu podatnym na działanie enzymu,
 - 4.2. *nieaktywne* - kiedy enzym, atakuje cząsteczkę amylopektyny w miejscu niepodatnym na działanie glukoamylazy lub enzym atakuje inną cząsteczkę.
5. Miejscem podatnym na działanie glukoamylazy są wiązania α -1 \rightarrow 4 między pierwszą i drugą podjednostką glukozy w łańcuchu A, B lub C cząsteczki amylopektyny, licząc od końca nieredukującego. Hydrolizowane wiązanie musi być oddalone co najmniej o trzy podjednostki, licząc od punktu rozgałęzienia.
6. Ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylopektyny potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy wynosi:

$$wgl_{ap} = \sum_{x=1}^y \text{Int}(w_{ap,x} - 2),$$

gdzie y jest ilością łańcuchów w cząsteczce amylopektyny, a x ilością podjednostek glukozy w danym łańcuchu licząc od końca nieredukującego do pierwszego miejsca rozgałęzienia.

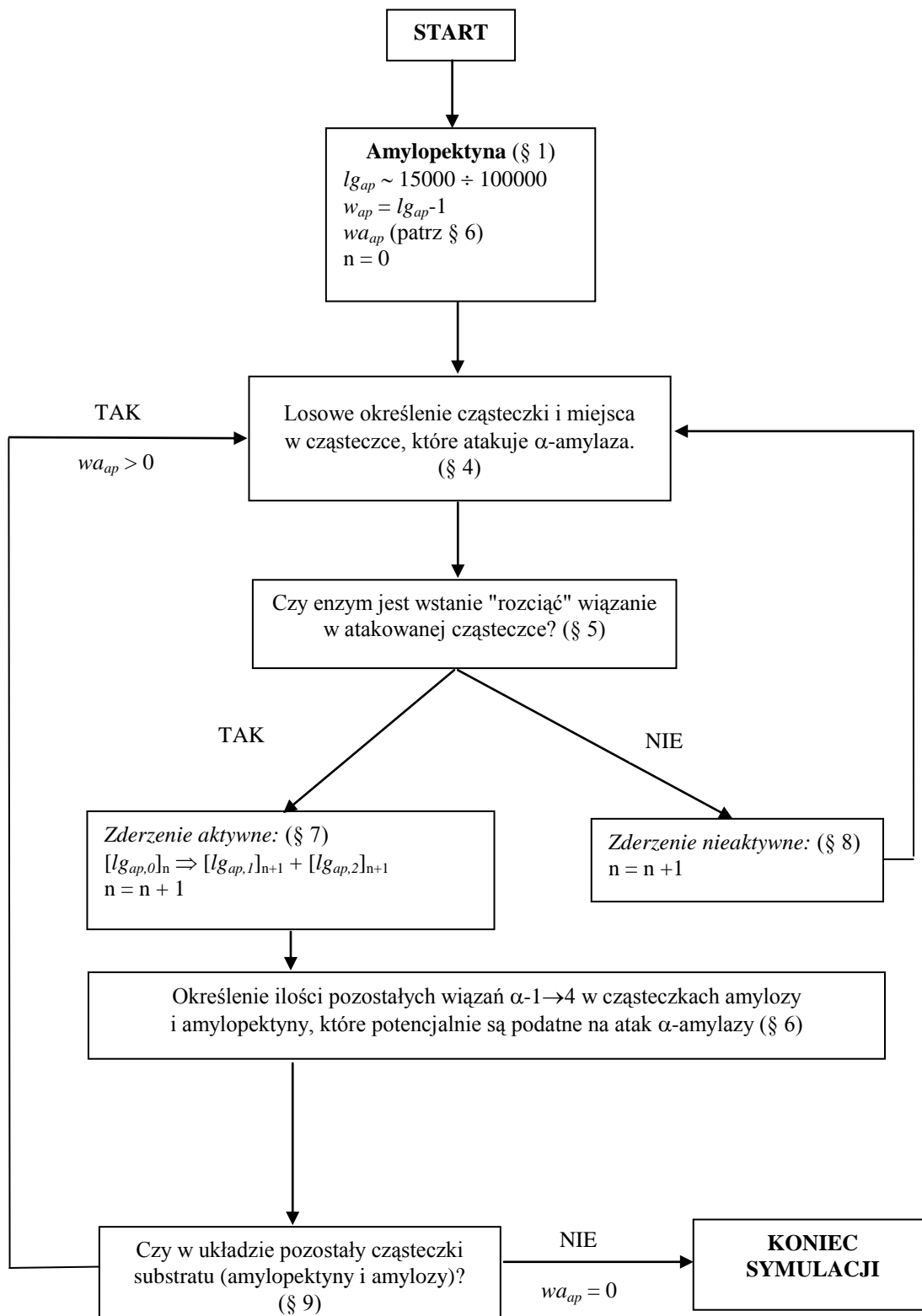
7. W wyniku zderzenia aktywnego, od końca nieredukującego odcinana jest cząsteczka maltozy:
 - 7.1. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylopektyny maleje o jedną: $[lg_{ap}]_n \Rightarrow [lg_{ap} - 1]_{n+1}$,
 - 7.2. ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylopektyny maleje o jedno: $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap} - 1]_{n+1}$,
 - 7.3. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
8. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 8.1. liczba cząsteczek w układzie pozostaje bez zmian,
 - 8.2. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylopektyny pozostaje bez zmian: $[lg_{ap}]_n \Rightarrow [lg_{ap}]_{n+1}$,
 - 8.3. ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylopektyny pozostaje bez zmian: $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap}]_{n+1}$,
 - 8.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
9. Za koniec reakcji przyjmuje się najmniejszą iterację, dla której ilość wiązań α -1 \rightarrow 4, w cząsteczkach amylopektyny, potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania glukoamylazy wynosi zero: $wgl_{ap} = 0$.
10. Miarą postępu reakcji jest ilość końców redukujących uwalnianych podczas procesu hydrolizy amylopektyny przez glukoamylazę.

Hydroliza amylopektyny przy udziale glukoamylazy - schemat blokowy.



2.3.3.5 Hydroliza amylopektyny przy udziale α -amylazy.

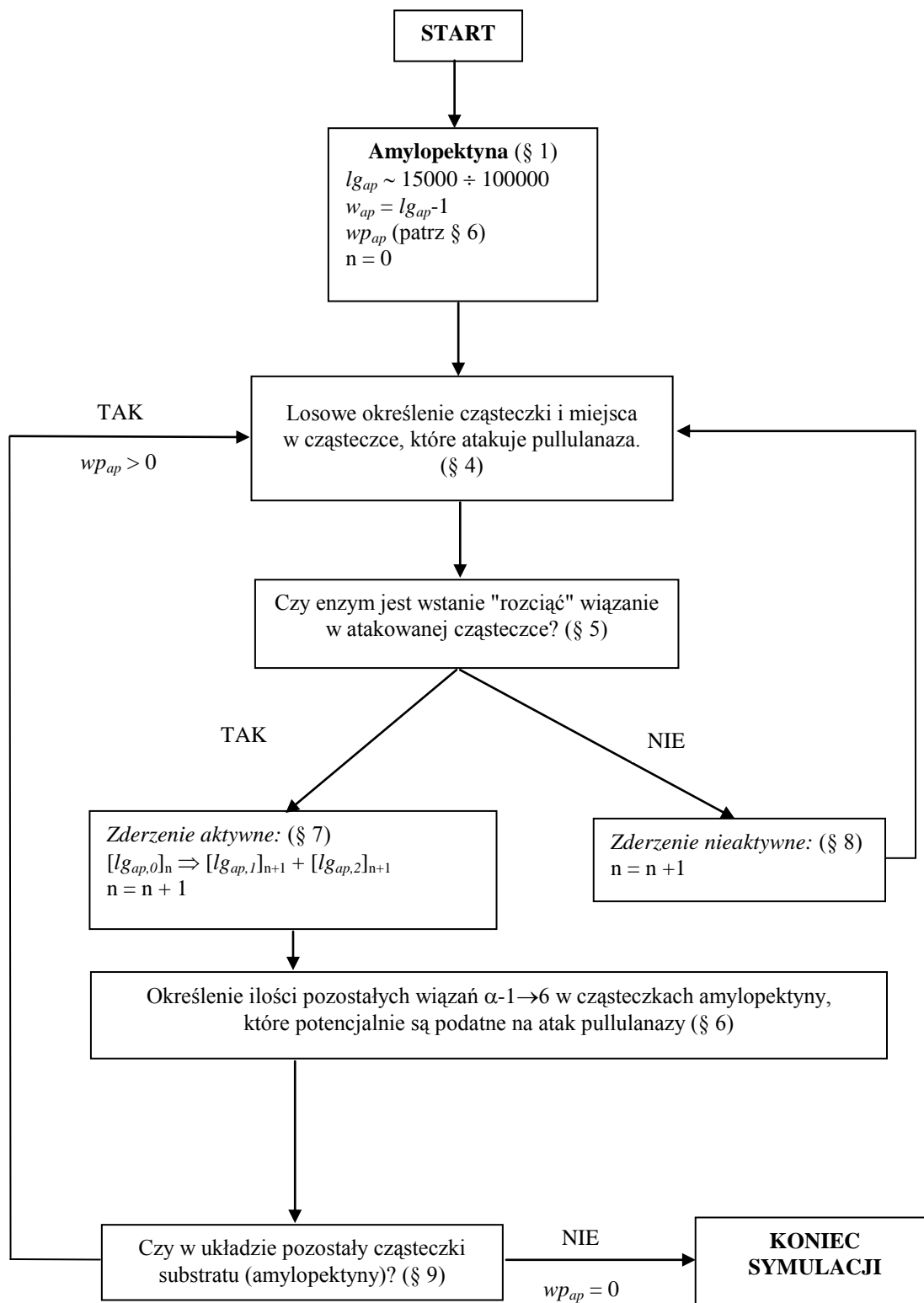
1. Cząsteczkami substratów są cząsteczki amylopektyny i dodatkowo amylozy, które mogą powstawać w wyniku hydrolizy cząsteczek amylopektyny pod wpływem α -amylazy. Dla amylopektyny ze skrobi ziemniaczanej przyjmuje się $I_{g_{ap}} \sim 15000 \div 100000$. Liczba rozpatrywanych cząsteczek substratu w modelu jest nieograniczona.
2. Końcowymi produktami reakcji są cząsteczki maltozy, maltotriozy i dektryny graniczne.
3. Symulacja reakcji odbywa się w oparciu o losowe określenie miejsca ataku enzymu na cząsteczki zawarte w roztworze. W sposób losowy określana jest liczba z przedziału $1 \div I_{g_{calk}}$, która w jednoznaczny sposób określa podjednostkę glukozy wraz cząsteczkę cukru w której się zawiera oraz wiązanie przy węglu C₁ w danej podjednostce.
4. Rozpatrywane są dwa typy zderzeń:
 - 4.1. *aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę cukru, w miejscu podatnym na działanie enzymu,
 - 4.2. *nieaktywne* - kiedy enzym, atakuje cząsteczkę polimeru w miejscu niepodatnym na działanie α -amylazy lub enzym atakuje inną cząsteczkę.
5. Miejscem podatnym na działanie α -amylazy są wiązania α -1 \rightarrow 4 wewnątrz łańcucha poliglukozowego. Wiązanie hydrolizowane przez α -amylazę w cząsteczce amylozy musi być:
 - 5.1. co najmniej oddalone o dwie reszty glukozy od końca redukującego,
 - 5.2. co najmniej oddalone o dwie reszty glukozy od końca nieredukującego,
 - 5.3. co najmniej oddalone o dwie reszty glukozy miejsca rozgałęzienia w kierunku końca redukującego,
 - 5.4. co najmniej oddalone o dwie reszty glukozy miejsca rozgałęzienia w kierunku końca nieredukującego w łańcuchu nadrzędnym,
 - 5.5. co najmniej oddalone o trzy reszty glukozy miejsca rozgałęzienia w kierunku końca redukującego w łańcuchu podrzędnym.
6. Ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczkach policukrów, które potencjalnie są podatne na atak α -amylazy zliczana jest w sposób rekurencyjny. Równa jest ona sumie wszystkich wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylopektyny spełniających jednocześnie wszystkie warunki zawarte w pkt. 5.1. \div 5.5.
7. W wyniku zderzenia aktywnego, cząsteczka polimeru rozcinana jest na dwa policukry:
 - 7.1. suma ilości podjednostek glukozy w obu powstałych policukrach odpowiada ilości podjednostek glukozy w wyjściowej cząsteczce amylopektyny: $[I_{g_{ap,0}}]_n \Rightarrow [I_{g_{ap,1}}]_{n+1} + [I_{g_{ap,2}}]_{n+1}$,
 - 7.2. suma dostępnych dla α -amylazy wiązań α -1 \rightarrow 4 w powstałych cząsteczkach policukrów obliczana jest wg § 6,
 - 7.3. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
8. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 8.1. liczba cząsteczek w układzie pozostaje bez zmian,
 - 8.2. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu polimeru pozostaje bez zmian: $[I_{g_{ap}}]_n \Rightarrow [I_{g_{ap}}]_{n+1}$,
 - 8.3. ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce polimeru pozostaje bez zmian: $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap}]_{n+1}$,
 - 8.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
9. Za koniec reakcji przyjmuje się najmniejszą iterację, dla której ilość wiązań α -1 \rightarrow 4, w cząsteczkach policukrów, potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania α -amylazy wynosi zero: $w_{a_{ap}} = 0$.
10. Miarą postępu reakcji jest ilość końców redukujących uwalnianych podczas procesu hydrolizy amylopektyny przez α -amylazę.

Hydroliza amylopektyny przy udziale α -amylazy - schemat blokowy.

2.3.3.6 Hydroliza amylopektyny przy udziale pullulanazy.

1. Częsteczkami substratów są cząsteczki amylopektyny.
Dla amylopektyny ze skrobi ziemniaczanej przyjmuje się $lg_{ap} \sim 15000 \div 100000$. Liczba rozpatrywanych cząsteczek substratu w modelu jest nieograniczona.
2. Końcowymi produktami reakcji są cząsteczki amylozy.
3. Symulacja reakcji odbywa się w oparciu o losowe określenie miejsca ataku enzymu na cząsteczki zawarte w roztworze. W sposób losowy określana jest liczba z przedziału $1 \div lg_{calc}$, która w jednoznaczny sposób określa podjednostkę glukozy wraz cząsteczkę cukru w której się zawiera oraz wiązanie przy węglu C₁ w danej podjednostce.
4. Rozpatrywane są dwa typy zderzeń:
 - 4.1. *aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę cukru, w miejscu podatnym na działanie enzymu,
 - 4.2. *nieaktywne* - kiedy enzym, atakuje cząsteczkę polimeru w miejscu niepodatnym na działanie α -amylazy lub enzym atakuje inną cząsteczkę.
5. Miejscem podatnym na działanie pullulanazy są wiązania α -1 \rightarrow 6 w cząsteczkach amylopektyny. Aby wiązanie α -1 \rightarrow 6 łączyła łańcuch nadrzędny z podrzędnym uległo hydrolizie w wyniku działania pullulanazy, muszą być spełnione jednocześnie następujące warunki:
 - 5.1. cząsteczka amylopektyny musi zawierać dwie podjednostki glukozy w łańcuchu nadrzędnym, licząc od miejsca rozgałęzienia w kierunku końca redukującego,
 - 5.2. cząsteczka amylopektyny musi zawierać jedną podjednostkę glukozy w łańcuchu nadrzędnym, licząc od miejsca rozgałęzienia w kierunku końca nieredukującego,
 - 5.3. hydrolizowane wiązanie α -1 \rightarrow 6 musi być oddalone przynajmniej o trzy podjednostki glukozy (zarówno w łańcuchu nadrzędnym, jak i podrzędnym) od innych punktów rozgałęzienia..
6. Ilość wiązań α -1 \rightarrow 6 w cząsteczkach amylopektyny, które potencjalnie są podatne na atak pullulanazy zliczana jest w sposób rekurencyjny. Równa jest ona sumie wszystkich wiązań α -1 \rightarrow 6 w cząsteczce amylopektyny spełniających jednocześnie wszystkie warunki zawarte w pkt. 5.1. ÷ 5.3.
7. W wyniku zderzenia aktywnego, cząsteczka polimeru rozcinana jest na dwa polocukry:
 - 7.1. suma ilości podjednostek glukozy w obu powstałych polocukrach odpowiada ilości podjednostek glukozy w wyjściowej cząsteczce amylopektyny: $[lg_{ap,0}]_n \Rightarrow [lg_{ap,1}]_{n+1} + [lg_{ap,2}]_{n+1}$,
 - 7.2. suma dostępnych dla pullulanazy wiązań α -1 \rightarrow 4 w powstałych cząsteczkach polocukrów obliczana jest wg § 6.,
 - 7.3. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
8. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 8.1. liczba cząsteczek w układzie pozostaje bez zmian,
 - 8.2. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu polimeru pozostaje bez zmian: $[lg_{ap}]_n \Rightarrow [lg_{ap}]_{n+1}$,
 - 8.3. ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce polimeru pozostaje bez zmian: $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap}]_{n+1}$,
 - 8.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
9. Za koniec reakcji przyjmuje się najmniejszą iterację, dla której ilość wiązań α -1 \rightarrow 6, w cząsteczkach amylopektyny, potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania pullulanazy wynosi zero: $w_{p,ap} = 0$.
10. Miarą postępu reakcji jest ilość końców redukujących uwalnianych podczas procesu hydrolizy amylopektyny przez pullulanazę.

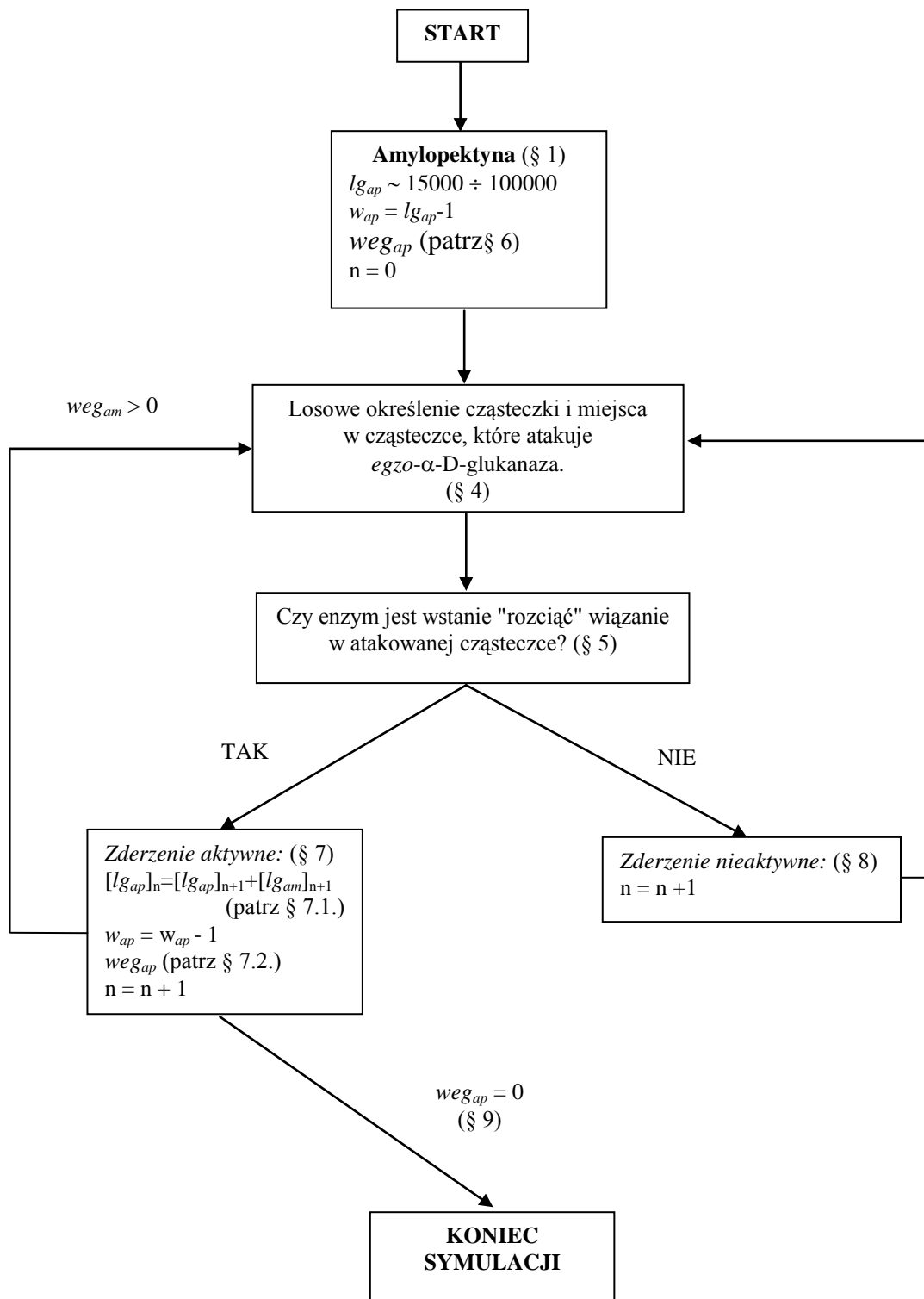
Hydroliza amylopektyny przy udziale pullulanazy - schemat blokowy.



2.3.3.7 Hydroliza amylopektyny przy udziale *egzo- α -D-glukanazy*.

1. Częsteczkami substratów są cząsteczki amylopektyny. Dla amylopektyny ze skrobi ziemniaczanej przyjmuje się $I_{g_{ap}} \sim 15000 \div 100000$. Liczba rozpatrywanych cząsteczek substratu w modelu jest nieograniczona.
2. Końcowymi produktami reakcji są cząsteczki maltooligosacharydów zawierających od 4 do 7 podjednostek glukozy oraz dekstryny graniczne.
3. Symulacja reakcji odbywa się w oparciu o losowe określenie miejsca ataku enzymu na cząsteczki zawarte w roztworze. W sposób losowy określana jest liczba z przedziału $1 \div I_{g_{calc}}$, która w jednoznaczny sposób określa podjednostkę glukozy wraz cząsteczkę cukru w której się zawiera oraz wiązanie przy węglu C_1 w danej podjednostce.
4. Rozpatrywane są dwa typy zderzeń:
 - 4.1. *aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę amylopektyny, w miejscu podatnym na działanie enzymu,
 - 4.2. *nieaktywne* - kiedy enzym, atakuje cząsteczkę amylopektyny w miejscu niepodatnym na działanie glukoamylazy lub enzym atakuje inną cząsteczkę.
5. Miejscem podatnym na działanie *egzo- α -D-glukanazy* są wiązania α -1 \rightarrow 4 zlokalizowane w łańcuchach A, B lub C cząsteczek amylopektyny, oddalone od 4 do 7 podjednostek glukozy licząc od końca nieredukującego danego łańcucha. Aby atakowane wiązanie α -1 \rightarrow 4 uległo hydrolizie w wyniku działania *egzo- α -D-glukanazy* muszą być spełnione jednocześnie następujące warunki:
 - 5.1. hydrolizowane wiązanie musi być oddalone od 4 do 7 podjednostek glukozy od końca nieredukującego danego łańcucha,
 - 5.2. potencjalnie "odcinany" łańcuch maltooligosacharydowy nie może zawierać miejsc rozgałęzienia,
 - 5.3. hydrolizowane wiązanie musi być oddalone co najmniej o trzy podjednostki glukozy od miejsca rozgałęzienia.
6. Ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczkach amylopektyny, które potencjalnie są podatne na atak *egzo- α -D-glukanazy* zliczana jest w sposób rekurencyjny. Równa jest ona sumie wszystkich wiązań α -1 \rightarrow 6 w cząsteczce amylopektyny spełniających jednocześnie wszystkie warunki zawarte w pkt. 5.1. \div 5.3.
7. W wyniku zderzenia aktywnego, od końca nieredukującego odcinana jest cząsteczka maltooligosacharydu zawierającego odpowiednio od 4 do 7 podjednostek glukozy:
 - 7.1. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylopektyny o określoną ilość podjednostek glukozy: $[I_{g_{ap}}]_n = [I_{g_{ap}}]_{n+1} + [I_{g_{am}}]_{n+1} \therefore [I_{g_{am}}]_{n+1} = 4 \div 7$,
 - 7.2. suma dostępnych dla *egzo- α -D-glukanazy* wiązań α -1 \rightarrow 4 glikozydowych w cząsteczce amylopektyny obliczana jest wg § 6,
 - 7.3. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
8. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 8.1. liczba cząsteczek w układzie pozostaje bez zmian,
 - 8.2. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylopektyny pozostaje bez zmian: $[I_{g_{ap}}]_n \Rightarrow [I_{g_{ap}}]_{n+1}$,
 - 8.3. ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylopektyny pozostaje bez zmian: $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap}]_{n+1}$,
 - 8.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
9. Za koniec reakcji przyjmuje się najmniejszą iterację, dla której ilość wiązań α -1 \rightarrow 4, w cząsteczkach amylopektyny, potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania *egzo- α -D-glukanazy* wynosi zero: $w_{g_{ap}} = 0$.
10. Miarą postępu reakcji jest ilość końców redukujących uwalnianych podczas procesu hydrolizy amylopektyny przez *egzo- α -D-glukanazę*.

Hydroliza amylopektyny przy udziale *egzo-α-D*-glukanazy - schemat blokowy.



2.4 Zestawienie danych doświadczalnych z modelem

Możliwość przejścia z układu modelowego do układu rzeczywistego jest niezwykle ważne. Umożliwia ono nie tylko weryfikację opracowanego modelu i jego założeń, ale także jego późniejsze wykorzystanie do celów praktycznych.

2.4.1 Opis układu rzeczywistego

Kinetykę reakcji chemicznej opisujemy zwykle podając zależność zmiany stężeń poszczególnych substancji w czasie. Zależność tą możemy określić poprzez podanie konkretnych wartości stężeń danej substancji w czasie lub poprzez podanie funkcji opisującej zmiany ilości poszczególnych substancji w układzie. Obrazowo możemy to przedstawić w ten sposób, iż w jednostkowej objętości określamy w sposób ciągły lub w określonych odstępach czasu stężenia określonych substancji. Standardowo za objętość jednostkową przyjmujemy objętość jednego dm^3 lub m^3 . Stężenia substancji możemy określić na przykład poprzez wyrażenie masy lub liczności danej substancji w jednostkowej objętości. Za jednostkę czasu przyjmuje się wielkość krotną sekundy, która odpowiada szybkości reakcji*.

W dalszej części pracy zaprezentowano równorzędne metody translacji układu modelowego do układu rzeczywistego opisanego poprzez podanie zmian stężeń molowych [mol/m^3] w czasie [s]. Generalnie, aby dokonać opisanej translacji konieczne jest wykonanie modelowej symulacji dla pojedynczej reakcji enzymatycznej, dla której dysponujemy danymi doświadczalnymi opisującymi jej kinetykę. Po wykonaniu translacji, wyznaczana jest skala przekształcenia, co umożliwia bezpośrednie przeliczenie wielkości uzyskiwanych w modelu na wielkości fizyczne, takie jak stężenie molowe i czas reakcji.

* Teoretycznie zaprezentowany w pracy model może opisywać dowolnie duży układ. Jednakże w typowym układzie fizycznym mamy zwykle do czynienia z 10^{18} do 10^{27} cząsteczek w objętości jednego dm^3 . Dlatego, ze względów praktycznych zredukowano ilość rozpatrywanych w pracy cząsteczek do objętości reprezentatywnej dla całego układu (od 1 do 10^6).

2.4.2 Wyznaczenie stałej przeskalanowania w oparciu o liczbę obrotów

Przejście z układu modelowego do rzeczywistego odbywa się w dwóch niezależnych etapach: przeliczeniu ilości cząsteczek rozpatrywanych w modelowym układzie na stężenia molowe [mol/dm^3] oraz kroku symulacji (liczby iteracji) na jednostki czasu [s].

Przyjmijmy, że w pewnej objętości jednostkowej znajduje się określona liczba cząsteczek substratu i enzymu. Stężenie początkowe w układzie modelowym (wyrażane poprzez funkcję charakterystyczną) odpowiada stężeniu początkowemu w układzie rzeczywistym wyrażonemu stężeniem molowym ($c_{t=0}$ [mol/dm^3]). Stężenie końcowe w układzie modelowym, odpowiada ilości powstałych cząsteczek w układzie, w którym wszystkie cząsteczki substratów i produktów pośrednich zostały przekształcone na produkty końcowe. W praktyce za stężenie końcowe produktów, przyjmujemy takie stężenie, które jest osiągnięte po pewnym czasie (t_k) i które nie ulega późniejszym zmianą (przy zachowanych warunkach reakcji). Znając relację między stężeniami początkowymi i końcowymi, z wynikami symulacji komputerowej, możemy wyznaczyć stałą przeskalanowania, wiążącą stężenia cukrów wyznaczanych w reakcji z DNS z funkcją charakterystyczną zdefiniowaną w modelu. W Tabeli 1 poniżej zestawiono przykładowe wielkości wyznaczane przy badaniu kinetyki reakcji enzymatycznej degradacji skrobi z symulacją komputerową.

Tabela 1. Przykładowe zestawienie wielkości wyznaczanych przy badaniu kinetyki reakcji enzymatycznej degradacji skrobi z symulacją komputerową.

REAKCJA CHEMICZNA		MODEL (SYMULACJA KOMPUTEROWA)	
WIELKOŚĆ	OPIS	WIELKOŚĆ	OPIS
$c_{S,0}$ [mol/dm^3]	Stężenie substratu w chwili $t=0$, równe ilości końców redukujących oznaczonych w reakcji z DNS.	Liczba cząsteczek [-] dla iteracji $n=0$.	Liczba cząsteczek określona przez funkcję charakterystyczną ("liczba zer") dla iteracji $n=0$ (początek reakcji).
$c_{S+p,k}$ [mol/dm^3]	Stężenie końcowe cukrów w chwili $t=t_k$, równe ilości końców redukujących oznaczonych w reakcji z DNS.	Liczba cząsteczek [-] dla iteracji $n=n_k$.	Liczba cząsteczek określona przez funkcję charakterystyczną ("liczba zer") dla iteracji $n=n_k$ (koniec reakcji)
$c_{S,k}$ [mol/dm^3]	Stężenie końcowe produktów. Ponieważ w reakcji z DNS nie rozróżnialne są cząsteczki substratów, produktów pośrednich i końcowych, równe jest ono różnicy oznaczonemu stężeniu mieszaniny w chwili t minus stężenie początkowe: $c_{p,k} = c_{S+p,k} - c_{S,0}$	Różnica liczby cząsteczek [-] dla iteracji $n=n_k$ minus liczba cząsteczek [-] dla iteracji $n=0$.	Liczba cząsteczek powstałych podczas symulacji.
c_{gl} [mol/dm^3]	Stężenie glukozy w układzie przy całkowitej hydrolizie policukrów do wolnej glukozy (np. pod wpływem gorącego kwasu solnego).	lg_{calc}	Całkowita liczba podjednostek glukozy w rozpatrywanym układzie, równa ilości parametrów funkcji charakterystycznej.

Kolejnym etapem jest wyznaczenie skali czasowej. Załóżmy, że dobraliśmy tak objętość jednostkową, aby znajdowała się w niej jedna cząsteczka enzymu. Śledząc jej zachowanie, możemy stwierdzić, iż w układzie modelowym, mamy do czynienia jedynie z dwoma rodzajami zdarzeń: zderzeniem aktywnym i zderzeniem nieaktywnym. W najprostszym przypadku czasy zderzenia aktywnego i nieaktywnego są sobie równe ($t_{ak} = t_{nak}$). Możemy wtedy przyjąć, że każdej rozpatrywanej iteracji odpowiada jednakowy przedział czasu, a czas reakcji równy jest sumie tych przedziałów, co można zapisać:

$$t_R = \sum_{n=0}^{n_k} [t_{ak}]_n = n_k \cdot t_{ak} = \sum_{n=0}^{n_k} [t_{nak}]_n = n_k \cdot t_{nak}.$$

W większości przypadków jednak czas zderzenia aktywnego, jest różny od czasu zderzenia nieaktywnego. W tym przypadku, można zmodyfikować opracowany model, poprzez wprowadzenie dodatkowych założeń:

1. W celu opisanie czasu reakcji, zostaje wprowadzona dodatkowa zmienna: t_R , oznaczająca czas reakcji.
2. W chwili rozpoczęcia symulacji dla $n=0$, $t_R = 0$ (o ile nie założono inaczej).
3. W przypadku zderzenia aktywnego, wartość t_R zwiększana jest o stałą czasową odpowiadającą czasowi zderzenia aktywnego: $t_R = t_R + t_{ak}$.
4. W przypadku zderzenia nieaktywnego, wartość t_R zwiększana jest o stałą czasową odpowiadającą czasowi zderzenia nieaktywnego: $t_R = t_R + t_{nak}$.
5. Czasowi reakcji odpowiada wartość zmiennej t_R dla najmniejszej iteracji, dla której ilość wiązań mogących ulec zerwaniu w wyniku działania danego enzymu wynosi zero.

W praktyce stałe t_{ak} i t_{nak} mogą być wyznaczone metodami stosowanymi w biochemii (np. metodą *stop flow*). W przypadku, kiedy większość zderzeń jest aktywnych, można przyjąć, że stała t_{ak} jest odwrotnością liczby obrotów enzymu (ang. *turnover number*), zdefiniowanej jako “ilość moli substratu transformowanego na minutę przez jeden mol aktywnych cząsteczek enzymów lub centrów katalitycznych w przypadku enzymów zawierających wiele podjednostek katalitycznych w optymalnych warunkach” * [18].

* Liczbę obrotów enzymu określa się także, jako ilość moli substancji transformowanych na minutę przez jeden mol enzymu (lub jeden μmol enzymu) w optymalnych warunkach [18].

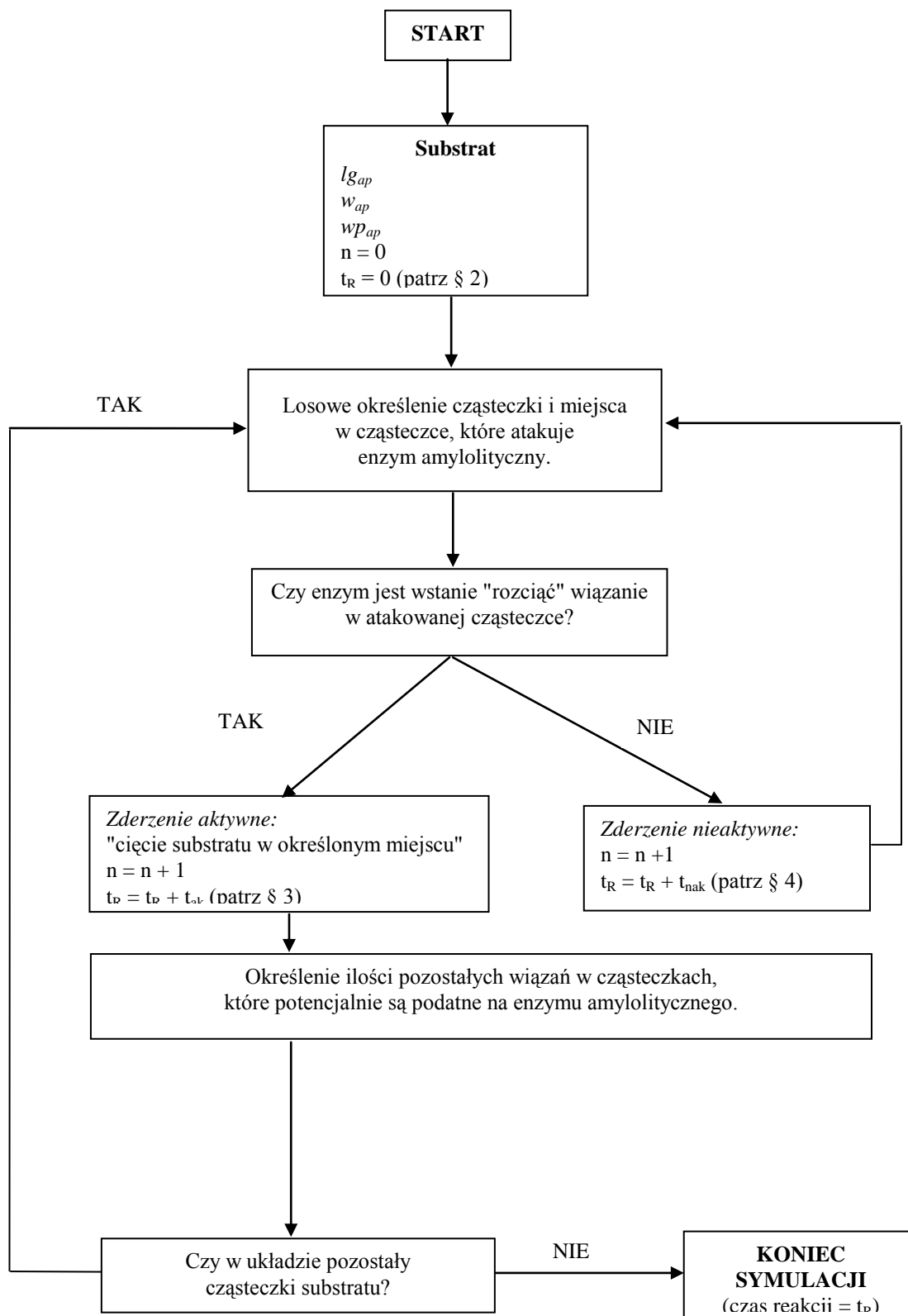
Zależność liczby obrotów od prędkości maksymalnej i całkowitego stężenia enzymu wyraża zależność:

$$k_p = \frac{V_{max}}{c_{E,tot.}} = \left[\frac{\text{mmol}(\text{S} \rightarrow \text{P}) \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}}{\text{mmol}(\text{E}) \cdot \text{ml}^{-1}} \right] = [\text{min}^{-1}]$$

gdzie k_p jest liczbą obrotów enzymu; V_{max} prędkością maksymalną; $c_{E,tot.}$ całkowitym stężeniem enzymu. Zwykle liczba obrotów enzymu zawiera się w przedziale od 50 do 10^7 min^{-1} . Przykładowo, dla anhidrazy węglowej $k_p = 3,6 \cdot 10^7$, czyli $1/k_p = t_{ak} = 1,7 \text{ } \mu\text{s}$.

Omówione powyżej modyfikacje przedstawiono na schemacie zamieszczonym na kolejnej stronie.

Hydroliza skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych z uwzględnieniem czasów zderzeń aktywnych i nieaktywnych - schemat ogólny



2.4.3 Wyznaczenie stałej przeskalowania w oparciu o wyznaczenie dwóch punktów stałych.

Transformacji układu modelowego do układu rzeczywistego opisującego enzymatyczną hydrolizę biopolimerów można dokonać poprzez wyznaczenie dwóch punktów dla układu modelowego i rzeczywistego odpowiadającym tym samym etapom reakcji. W pracy wybrano arbitralnie jako punkty charakterystyczne:

- pierwszy punkt - punkt odpowiadający warunkom początkowym reakcji,
- drugi punkt - punkt w którym osiągnięto 50% przereagowanie substratu.

Opis tych punktów dla układu rzeczywistego i modelowego przedstawiono poniżej:

Tabela 2. Zestawienie wybranych arbitralnie punktów do transformacji układu modelowego do rzeczywistego.

Nazwa punktu	Układ rzeczywisty	Układ modelowy
“punkt początkowy”	Stężenie substratu w chwili t_0 : $c_{S,0}$	Ilość cząsteczek dla iteracji zerowej
“punkt 50%”	Punkt, w którym stężenie substratu osiągnęło połowę wielkości stężenia początkowego, wyznaczony zależnością: $c_{50\%,t} = \frac{1}{2} (c_{S+P,k} - c_{S,0})$	Odpowiada numerowi iteracji, dla którego liczba cząsteczek równa jest różnicy liczby cząsteczek dla iteracji $n=n_k$ minus liczba cząsteczek dla iteracji $n=0$.

W przypadku enzymów zachowujących się zgodnie z kinetyką Michaelisa-Menten można za drugi punkt, w którym dla określonego stężenia substratu (równego stałej Michaelisa-Menten) osiągnięta jest połowa szybkości maksymalnej reakcji [12]. Ponieważ w przypadku degradacji biopolimerów nie są spełnione wszystkie założenia modelu Michaelisa-Menten [17], a w kilku zestawach danych doświadczalnych zaobserwowano, że reakcja przebiega przez pewien okres czasu z połową maksymalnej obserwowanej prędkości reakcji, zrezygnowano z wyboru tego punktu jako odniesienia przy transformacji.

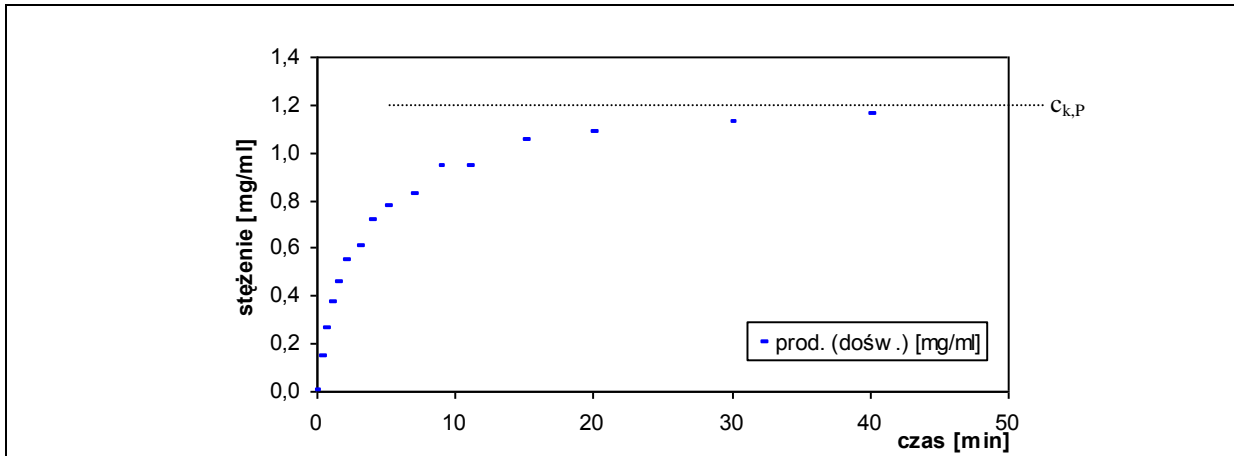
Transformacji dokonuje się zestawienie punktu początkowego dla układu rzeczywistego z punktem początkowym dla układu modelowego. Następnie wybiera się tak skalę czasową i stężeniową, aby pokrył się “drugi punkt” w układzie rzeczywistym z układem modelowym. W ten sposób określamy skalę czasową i stężeniową dla danego układu modelowego.

2.4.4 Wyznaczenie stałej przeskalowania metodą graficzną.

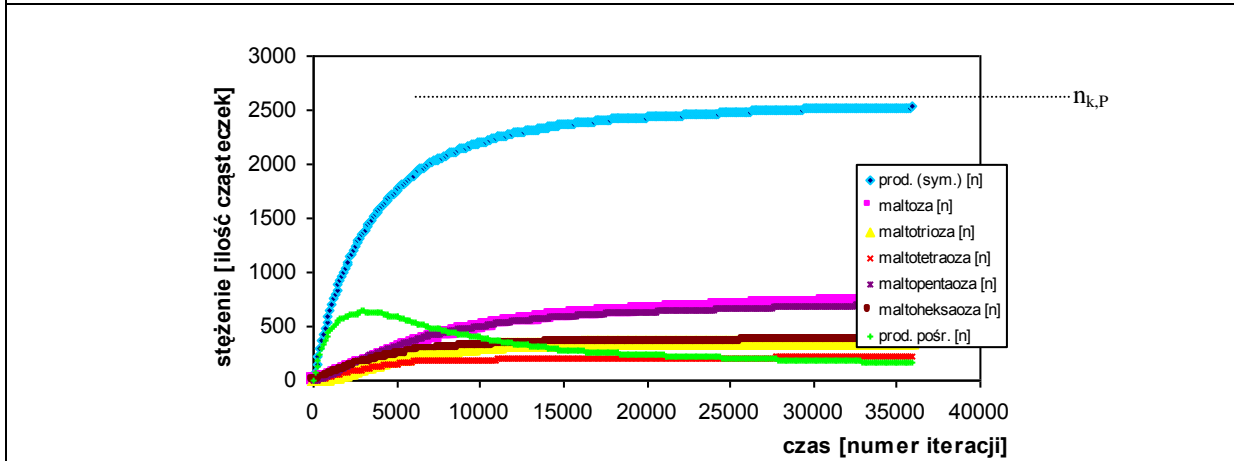
Translacji graficznej dokonujemy w dwuwymiarowym kartezjańskim układzie współrzędnych prostokątnych (układ ortonormalny 2D), gdzie oś odciętych odpowiada czasowi reakcji (numerowi iteracji), a oś rzędnych stężeniu produktów (przyrostowi ilości powstających cząsteczek). Za punkt stały przyjęto punkt początkowy zdefiniowany w poprzednim rozdziale, dla czasu t_0 i numeru iteracji $n=0$. Następnie dokonujemy takiego przeskalowania wykresu otrzymanego dla układu modelowego, względem wykresu obrazującego konkretne dane doświadczalne, aby:

- ❖ zachowany był punkt początkowy dla obu wykresów,
- ❖ suma odległość punktów doświadczalnych od punktów wyznaczonych w wyniku symulacji była jak najmniejsza (analogicznie do metody najmniejszych kwadratów).

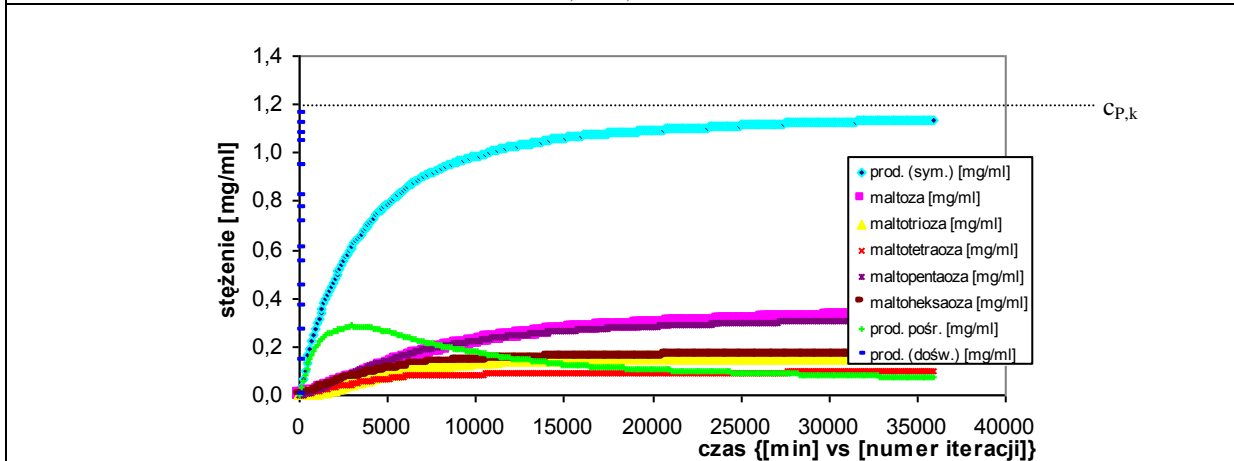
Efektem przeskalowania jest wyznaczenie stałej przeskalowania zawierającej w sobie skalę czasową i stężeniową dla danego układu modelowego.



a) Przykładowe dane eksperymentalne dla procesu hydrolizy skrobi przy udziale α -amylazy scukrzającej ($c_{S0}=1,16$ mg/ml; $c_E=5,30$ μ g/ml). Określenie stężenia końcowego produktu na podstawie asymptoty (linia przerywana), do której zbliżają się wartości określające stężenie produktu mierzone eksperymentalnie.

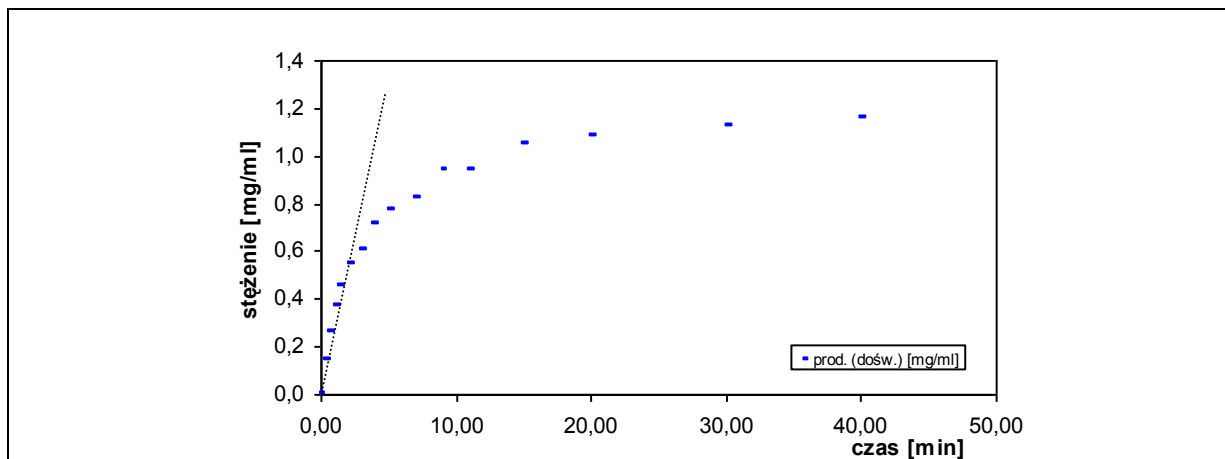


b) Dane z symulacji komputerowej. Określenie końcowej ilości cząsteczek w układzie modelowym. Wyznaczenia stałej przeskalowania stężenie $k_{st.} = c_{k,P} / n_{k,P}$ [mg/ml·n].

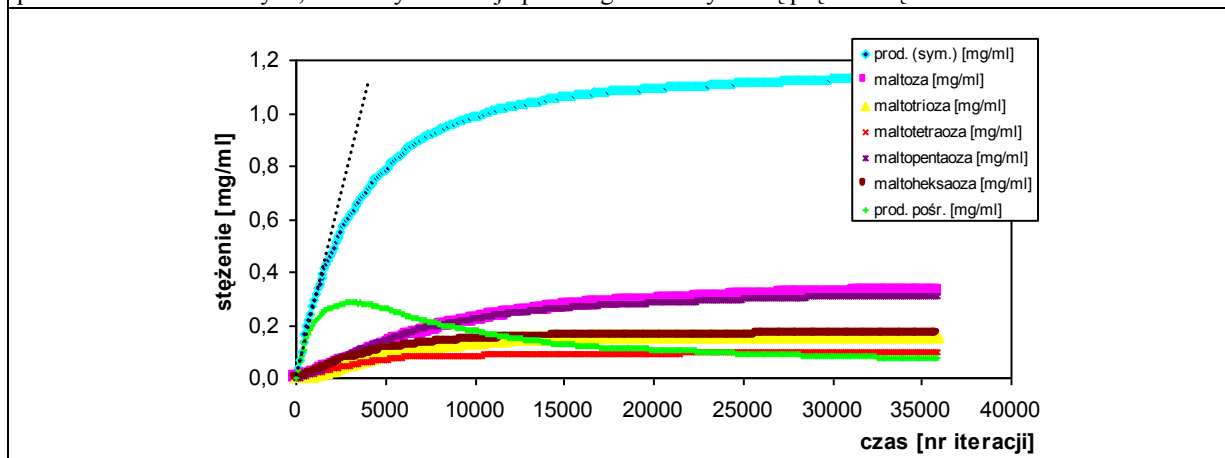


c) Przeskalowanie liczności cząsteczek z układu modelowego do układu rzeczywistego w oparciu o wyznaczoną stałą przeskalowania stężenie (pomnożenie wielkości odpowiadających ilości cząsteczek w układzie modelowym przez wyznaczoną wartość $k_{st.}$).

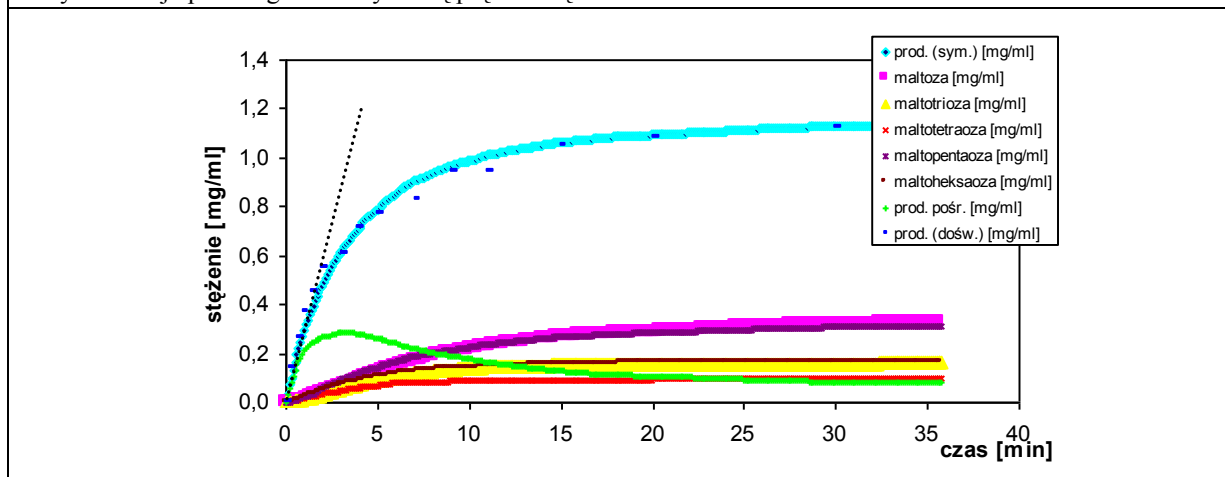
Rys.2.3. Schemat przeskalowanie liczności cząsteczek z układu modelowego do układu rzeczywistego (liczność cząsteczek [n] \rightarrow stężenie [mg/ml]).



a) Dane eksperymentalne. Określenie współczynnika nachylenia prostej (linia przerywana) dla początkowych punktów doświadczalnych, dla których reakcja przebiega z maksymalną prędkością.



b) Dane z symulacji komputerowej (dokonano wcześniejszego przeskalowania stężenia). Określenie współczynnika nachylenia prostej (linia przerywana) dla początkowych punktów z symulacji dla których reakcja przebiega z maksymalną prędkością.



c) Przeskalowanie liczności cząsteczek z układu modelowego do układu rzeczywistego w oparciu o wyznaczone współczynniki nachylenia prostych.

Rys.2.4. Schemat przeskalowanie czasu z układu modelowego do układu rzeczywistego (numer iteracji [i] → czas [min])

2.4.5 Translacja układu modelowego do układu rzeczywistego

Znając skalę stężeniową i czasową, łatwo jest przeliczyć wielkości uzyskiwane w układzie modelowym, na odpowiednie im wielkości charakteryzujące dany układ fizyczny. Przykładowo, jeżeli rozpatrujemy w układzie modelowym dziesięciokrotnie większe stężeniu substratu niż przy wyznaczaniu skali przeskalowania, to obrazowo odpowiada to wprowadzeniu do objętości jednostkowej dziesięciokrotnie większej liczby cząsteczek substratu. Aby więc dokonać przeskalowania względem stężenia, należy dziesięciokrotnie zwiększyć w układzie modelowym liczbę cząsteczek substratu i pomnożyć ją przez wyznaczoną uprzednio stałą przeskalowania stężeniowego.

Zmianę stężenia enzymu wpływa na szybkość reakcji. W przypadku, kiedy prędkość reakcji jest proporcjonalna do stężenia enzymu, tzn. $v = c_E \cdot f(c_S, c_P, T, \dots)$, można przyjąć że czas reakcji ulega proporcjonalnemu wydłużeniu lub skróceniu, w zależności od zmiany stężenia reakcji. Przykładowo, dwukrotny wzrost stężenia enzymu powinien spowodować dwukrotny wzrost szybkości reakcji, o ile oczywiście $c_S \gg c_E$.

Weryfikację, czy prędkość reakcji zależy w sposób liniowy od stężenia enzymu, można dokonać w sposób doświadczalny badając kinetykę reakcji dla różnych stężeń enzymu, przy zachowaniu innych parametrów reakcji. W przypadku, kiedy nie jest zachowana liniowość konieczne jest wyznaczenie w sposób empiryczny funkcji określającej zmianę szybkości reakcji od stężenia enzymu. Alternatywnie można rozpatrywać w układzie modelowym wprowadzenie do objętości jednostkowej odpowiedniej liczby cząsteczek enzymu, co zostanie przedstawione w dalszej części niniejszej pracy.

2.5 Modelowanie oddziaływań inhibicyjnych i aktywacyjnych.

W opracowanym modelu możliwe jest uwzględnienie oddziaływań inhibicyjnych i aktywacyjnych. Zdecydowano się rozpatrzeć inhibicję kompetycyjną, akompetycyjną, niekompetycyjną i aktywację enzymu. Przedstawiono ogólne założenia pozwalające na uwzględnienie w modelu wyżej wymienionych oddziaływań. Szczególną uwagę zwrócono na inhibicję kompetycyjną, gdyż niektóre pozycje literaturowe donoszą o możliwości wystąpienia tego typu inhibicji w przypadku np. β -amylazy (inhibicja kompetycyjna maltozą).

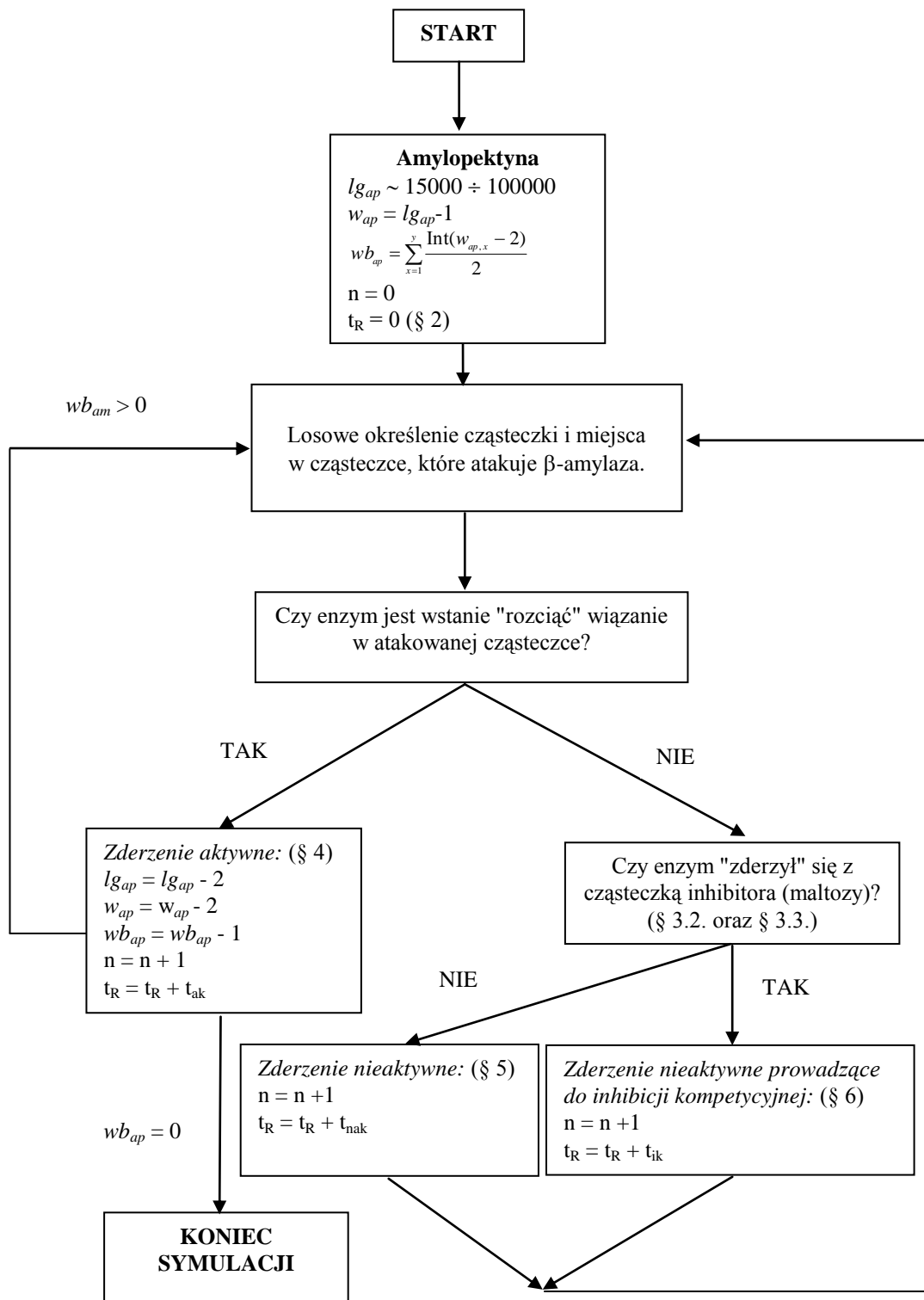
2.5.1 Inhibicja kompetycyjna

Z inhibicja kompetycyjną spotykamy się gdy inhibitor współzawodniczy z substratem w obsadzeniu centrum aktywnego enzymu. Jednoczesne wiązanie się substratu i inhibitora kompetycyjnego z enzymem jest wykluczone. Przykładem inhibicji kompetycyjnej może być wspomniana na inhibicja maltozą β -amylazy. W tym przypadku maltoza powstająca w wyniku reakcji, jako analog substratu, może ulec związaniu z miejscem aktywnym enzymu. Ponieważ jednak β -amylaza nie jest w stanie zhydrolizować maltozy, reakcja zostaje zatrzymana do momentu oddysocjowania maltozy od β -amylazy. Opisany przypadek nosi nazwę inhibicji kompetycyjnej produktem reakcji. Cechą charakterystyczną inhibicji kompetycyjnej jest możliwość jej cofnięcia przy dostatecznie dużym stężeniu substratu. Zjawisko to wykorzystuje się np. przy zatruciu metanolem lub glikolem etylenowym, a leczenie polega na podaniu bardzo dużej ilości etanolu [12]. W przypadku rozpatrywania inhibicji celowe jest operowanie czasem reakcji (t_R), oraz czasami zderzenia aktywnego (t_{ak}), zderzenia nieaktywnego (t_{nak}) i inhibicji kompetycyjnej (t_{ik}). Uwzględnienie inhibicji kompetycyjnej zakłada nałożenie na wcześniejsze modele następujących założeń:

1. W modelu uwzględniany jest czas reakcji.
2. W momencie rozpoczęcia reakcji wartość zmiennej określającej czas reakcji wynosi zero ($t_R = 0$).
3. Rozpatrywane są trzy typy zderzeń:
 - 3.1. *zderzenie aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę substratu w miejscu podatnym na jego działanie,
 - 3.2. *zderzenie nieaktywne* - zachodzące w przypadku, kiedy enzym atakuje cząsteczkę substratu w miejscu niepodatnym na jego działanie lub enzym atakuje inną cząsteczkę, nie będącą substratem i inhibitorem,
 - 3.3. *zderzenie prowadzące do inhibicji kompetycyjnej* - zachodzące w przypadku kiedy enzym atakuje cząsteczkę inhibitora kompetycyjnego (np. maltozy w przypadku β -amylazy).
4. W wyniku zderzenia aktywnego:
 - 4.1. krok symulacji zwiększany jest o jeden,
 - 4.2. enzym katalizuje hydrolizę określonego miejsca w cząsteczce substratu, zgodnie z opisem przyjętym w danym modelu dla określonego procesu enzymatycznego,
 - 4.3. czas reakcji zwiększany jest o czas trwania zderzenia aktywnego: $t_R = t_R + t_{ak}$.
5. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 5.1. krok symulacji zwiększany jest o jeden
 - 5.2. czas reakcji zwiększany jest o czas trwania zderzenia nieaktywnego: $t_R = t_R + t_{nak}$.
6. W wyniku zderzenia prowadzącego do inhibicji:
 - 6.1. krok symulacji zwiększany jest o jeden
 - 6.2. czas reakcji zwiększany jest o średni czas trwania kompleksu enzym-inhibitor kompetycyjny: $t_R = t_R + t_{ik}$.

Na sąsiedniej stronie przedstawiono przykładowy model uwzględniający inhibicję kompetycyjną opisujący omawiany przypadek inhibicji β -amylazy powstającą w trakcie procesu scukrzania skrobi maltozą.

Hydroliza amylopektyny przy udziale β -amylazy z uwzględnieniem inhibicji kompetycyjnej produktem reakcji (maltozą) - schemat blokowy.



2.5.2 Inhibicja akompetycyjna

Inhibicja akompetycyjną dotyczy przypadku, gdy inhibitor wiąże się z kompleksem substrat-enzym, powodując wydłużenie czasu reakcji. Inhibitor akompetycyjny jest w stanie przyłączyć się jedynie do kompleksu enzym-substrat.

Przy tworzeniu modelu rozważano dwie równorzędne ze względu na otrzymywane wyniki metody uwzględnienia inhibicji akompetycyjnej. Pierwsza zakładała, iż w przypadku zderzenia aktywnego, będzie rozpatrywana możliwość zderzenia cząsteczki kompleksu enzym-substrat z inhibitorem kompetycyjnym. Druga możliwość sprowadzała się do zastąpienia rozpatrywania zderzeń losowych, poprzez określenie prawdopodobieństwa takiego zdarzenia. Po przeprowadzeniu szeregu teoretycznych rozważań zdecydowano się wybrać drugi sposób, gdyż używając prawdopodobieństwa wystąpienia inhibicji akompetycyjnej stosunkowo łatwo można uwzględnić inne zjawiska występujące w układzie. Przykładowo, można założyć, że prawdopodobieństwo to jest funkcją długości (masy) cząsteczki substratu związanego z enzymem.

Podobnie jak w przypadku inhibicji kompetycyjnej, w model uwzględniający inhibicje akompetycyjną zakłada parametry opisujące czasy poszczególnych procesów: czas reakcji (t_R), czas zderzenia aktywnego (t_{ak}), zderzenia nieaktywnego (t_{nak}) i inhibicji akompetycyjnej (t_{iak}). Dodatkowo wprowadzono dodatkowy parametr nazwany *prawdopodobieństwem zajścia inhibicji akompetycyjnej* p_{iak} . Uwzględnienie inhibicji akompetycyjnej zakłada nałożenie na wcześniejsze modele następujących założeń:

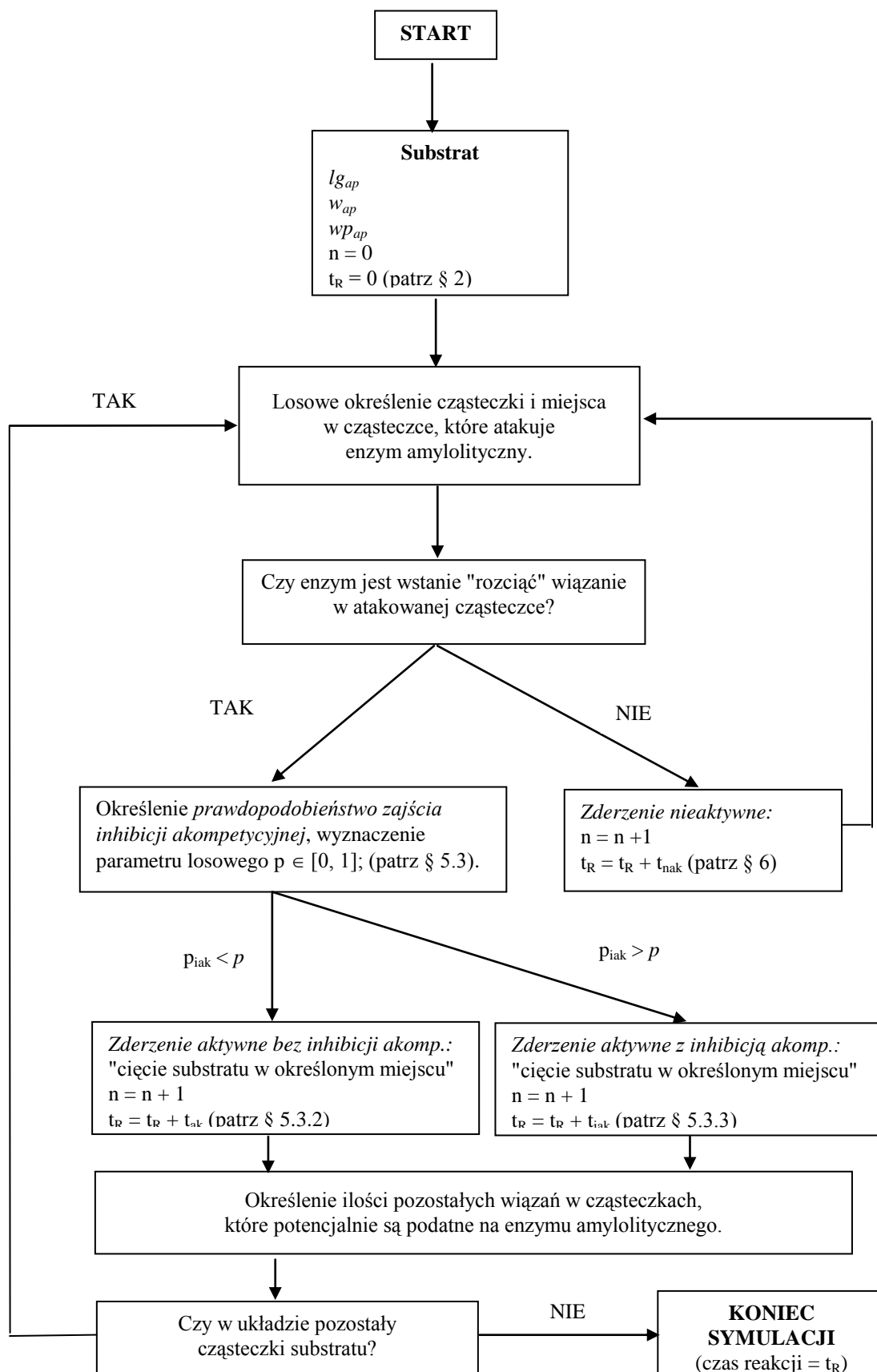
1. W modelu uwzględniany jest czas reakcji.
2. W momencie rozpoczęcia reakcji wartość zmiennej określającej czas reakcji wynosi zero ($t_R = 0$).
3. Rozpatrywane są trzy typy zderzeń:
 - 3.1. *zderzenie aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę substratu w miejscu podatnym na jego działanie; kompleks enzym-substrat nie jest stabilizowany przez obecność inhibitora akompetycyjnego,
 - 3.2. *zderzenie aktywne z inhibicją akompetycyjną* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę substratu w miejscu podatnym na jego działanie, a powstały kompleks enzym-substrat jest stabilizowany przez obecność inhibitora akompetycyjnego co wpływa na wydłużenie reakcji: $t_{ak} < t_{iak}$,
 - 3.3. *zderzenie nieaktywne* - zachodzące w przypadku, kiedy enzym atakuje cząsteczkę substratu w miejscu niepodatnym na jego działanie lub enzym atakuje inną cząsteczkę, nie będącą substratem i inhibitorem,
4. W celu opisanego *prawdopodobieństwa zajścia inhibicji akompetycyjnej*, został wprowadzony dodatkowy

parametr p_{iak} określający prawdopodobieństwo tej reakcji. Został on zdefiniowany następująco:

- 4.1. *prawdopodobieństwo zajścia inhibicji akompetycyjnej* określane jest liczbą rzeczywistą z przedziału domkniętego od zera do jeden: $p_{iak} \in [0, 1]$,
 - 4.2. dla substancji nie wykazujących powinowactwa do kompleksu enzym-substrat (nie będących inhibitorami akompetycyjnymi) wartość *prawdopodobieństwa zajścia inhibicji akompetycyjnej* przyjmuje wartość zero: $p_{iak} = 0$,
 - 4.3. w miarę wzrostu powinowactwa inhibitora kompetycyjnego do kompleksu enzym-substrat wartość parametru określającego *prawdopodobieństwo zajścia inhibicji akompetycyjnej* zbliża się do jedności. Wartość jeden oznacza, że każdy kompleks enzym-substrat zostaje związany z cząsteczką inhibitora akompetycyjnego: $p_{iak} = 1$,
 - 4.4. wartość parametru określającego *prawdopodobieństwo zajścia inhibicji akompetycyjnej* może być także zdefiniowana poprzez określenie zależności, np. poprzez określenie funkcji p_{iak} od masy kompleksu enzym-substrat: $p_{iak} = f(m_{ES})$ lub ilości cząsteczek inhibitora w układzie: $p_{iak} = f(C_{iak})$.
5. W wyniku zderzenia aktywnego, bądź zderzenia aktywnego z inhibicją akompetycyjną:
- 5.1. krok symulacji zwiększany jest o jeden,
 - 5.2. enzym katalizuje hydrolizę określonego miejsca w cząsteczce substratu, zgodnie z opisem przyjętym w danym modelu dla określonego procesu enzymatycznego,
 - 5.3. w oparciu o parametr p_{iak} oraz o parametr pomocniczy p , będący każdorazowo wyznaczaną losowo liczbą rzeczywistą z przedziału domkniętego od zera do jeden, określana jest możliwość zajścia inhibicji akompetycyjnej:
 - 5.3.1. jeżeli $p_{iak} = p$ to wartość p jest wyznaczana w sposób losowy ponownie do momentu do póki nie zajdzie warunek: $p_{iak} \neq p$,
 - 5.3.2. jeżeli $p_{iak} < p$ to zderzenie traktowane jest jako zderzenie aktywne bez inhibicji akompetycyjnej, a czas reakcji zwiększany jest o czas trwania zderzenia aktywnego: $t_R = t_R + t_{ak}$.
 - 5.3.3. jeżeli $p_{iak} > p$ to zderzenie traktowane jest jako zderzenie aktywne z inhibicją akompetycyjną, a czas reakcji zwiększany jest o czas trwania zderzenia aktywnego z inhibicją akompetycyjną: $t_R = t_R + t_{iak}$.
6. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
- 6.1. krok symulacji zwiększany jest o jeden
 - 6.2. czas reakcji zwiększany jest o czas trwania zderzenia nieaktywnego: $t_R = t_R + t_{nak}$.

Na sąsiedniej stronie przedstawiono ogólny model uwzględniający inhibicję akompetycyjną. Zaznaczone na schemacie symbolem § numery odwołań dotyczą przedstawionych powyżej modyfikacji modelu.

Hydroliza skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych z uwzględnieniem inhibicji akompetycyjnej - schemat ogólny



2.5.3 Inhibicja niekompetycyjna i aktywacja enzymu

W inhibicji substrat i inhibitor niekompetycyjny mogą się jednocześnie wiązać z danym enzymem, co oznacza iż centrum aktywne enzymu nie pokrywa się z miejsce przyłączania inhibitora niekompetycyjnego. W efekcie inhibitor może przyłączać się zarówno do cząsteczki wolnego enzymu jak i do kompleksu enzym-substrat.

Przy opisywaniu inhibicji niekompetycyjnej posłużono parametrami analogicznymi do wprowadzony przy opisie wcześniej prezentowanych typ inhibicji. Parametrami tymi są: czas reakcji (t_R), czas zderzenia aktywnego (t_{ak}), zderzenia nieaktywnego (t_{nak}) i inhibicji niekompetycyjnej (t_{ink}) oraz *prawdopodobieństwem zajścia inhibicji niekompetycyjnej* p_{ink} . Opisanie inhibicji niekompetycyjnej zakłada nałożenie na poprzednio przedstawiane modele następujących założeń:

1. W modelu uwzględniany jest czas reakcji.
2. W momencie rozpoczęcia reakcji wartość zmiennej określającej czas reakcji wynosi zero ($t_R = 0$).
3. Rozpatrywane są trzy typy zderzeń:
 - 3.1. *zderzenie aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę substratu w miejscu podatnym na jego działanie; a do cząsteczki enzymu nie jest przelączona cząsteczka inhibitora niekompetycyjnego,
 - 3.2. *zderzenie aktywne z inhibicją niekompetycyjną* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę substratu w miejscu podatnym na jego działanie, jednocześnie do enzymu poza jego centrum aktywnym przyłączona jest cząsteczka inhibitora niekompetycyjnego, co wpływa na wydłużenie reakcji: $t_{ak} < t_{ink}$,
 - 3.3. *zderzenie nieaktywne* - zachodzące w przypadku, kiedy enzym atakuje cząsteczkę substratu w miejscu niepodatnym na jego działanie lub enzym atakuje inną cząsteczkę, nie będąca substratem i inhibitorem,
4. W celu opisania *prawdopodobieństwa zajścia inhibicji niekompetycyjnej*, został wprowadzony dodatkowy parametr p_{iak} określający prawdopodobieństwo tej reakcji. Został on zdefiniowany następująco:
 - 4.1. *prawdopodobieństwo zajścia inhibicji niekompetycyjnej* określane jest liczbą rzeczywistą z przedziału domkniętego od zera do jeden: $p_{ink} \in [0, 1]$,
 - 4.2. dla substancji nie wykazujących powinowactwa do enzymu poza jego centrum aktywnym (nie będących inhibitorami niekompetycyjnymi) wartość *prawdopodobieństwa zajścia inhibicji niekompetycyjnej* przyjmuje wartość zero: $p_{ink} = 0$,
 - 4.3. w miarę wzrostu powinowactwa inhibitora niekompetycyjnego do cząsteczki enzymu z wyłączeniem jego centrum aktywnego, wartość parametru określającego *prawdopodobieństwo zajścia inhibicji niekompetycyjnej* zbliża się do jedności. Wartość jeden oznacza, że każdy

- każda cząsteczka enzymu jest związana z cząsteczką inhibitora niekompetycyjnego: $p_{\text{ink}} = 1$,
- 4.4. wartość parametru określającego *prawdopodobieństwo zajścia inhibicji niekompetycyjnej* może być także zdefiniowana poprzez określenie zależności, np. jako funkcja stężenia inhibitora niekompetycyjnego w układzie: $p_{\text{ink}} = f(c_{\text{ink}})$.
5. W wyniku zderzenia aktywnego, bądź zderzenia aktywnego z inhibicją niekompetycyjną:
 - 5.1. krok symulacji zwiększany jest o jeden,
 - 5.2. enzym katalizuje hydrolizę określonego miejsca w cząsteczce substratu, zgodnie z opisem przyjętym w danym modelu dla określonego procesu enzymatycznego,
 - 5.3. w oparciu o parametr p_{iak} oraz o parametr pomocniczy p , będący każdorazowo wyznaczaną losowo liczbą rzeczywistą z przedziału domkniętego od zera do jeden, określana jest możliwość zajścia inhibicji niekompetycyjnej:
 - 5.3.1. jeżeli $p_{\text{ink}} = p$ to wartość p jest wyznaczana w sposób losowy ponownie do momentu do póki nie zajdzie warunek: $p_{\text{iak}} \neq p$,
 - 5.3.2. jeżeli $p_{\text{ink}} < p$ to zderzenie traktowane jest jako zderzenie aktywne bez inhibicji niekompetycyjnej, a czas reakcji zwiększany jest o czas trwania zderzenia aktywnego: $t_{\text{R}} = t_{\text{R}} + t_{\text{ak}}$.
 - 5.3.3. jeżeli $p_{\text{ink}} > p$ to zderzenie traktowane jest jako zderzenie aktywne z inhibicją niekompetycyjną, a czas reakcji zwiększany jest o czas trwania zderzenia aktywnego z inhibicją niekompetycyjną: $t_{\text{R}} = t_{\text{R}} + t_{\text{ink}}$.
 6. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 6.1. krok symulacji zwiększany jest o jeden
 - 6.2. czas reakcji zwiększany jest o czas trwania zderzenia nieaktywnego: $t_{\text{R}} = t_{\text{R}} + t_{\text{nak}}$.

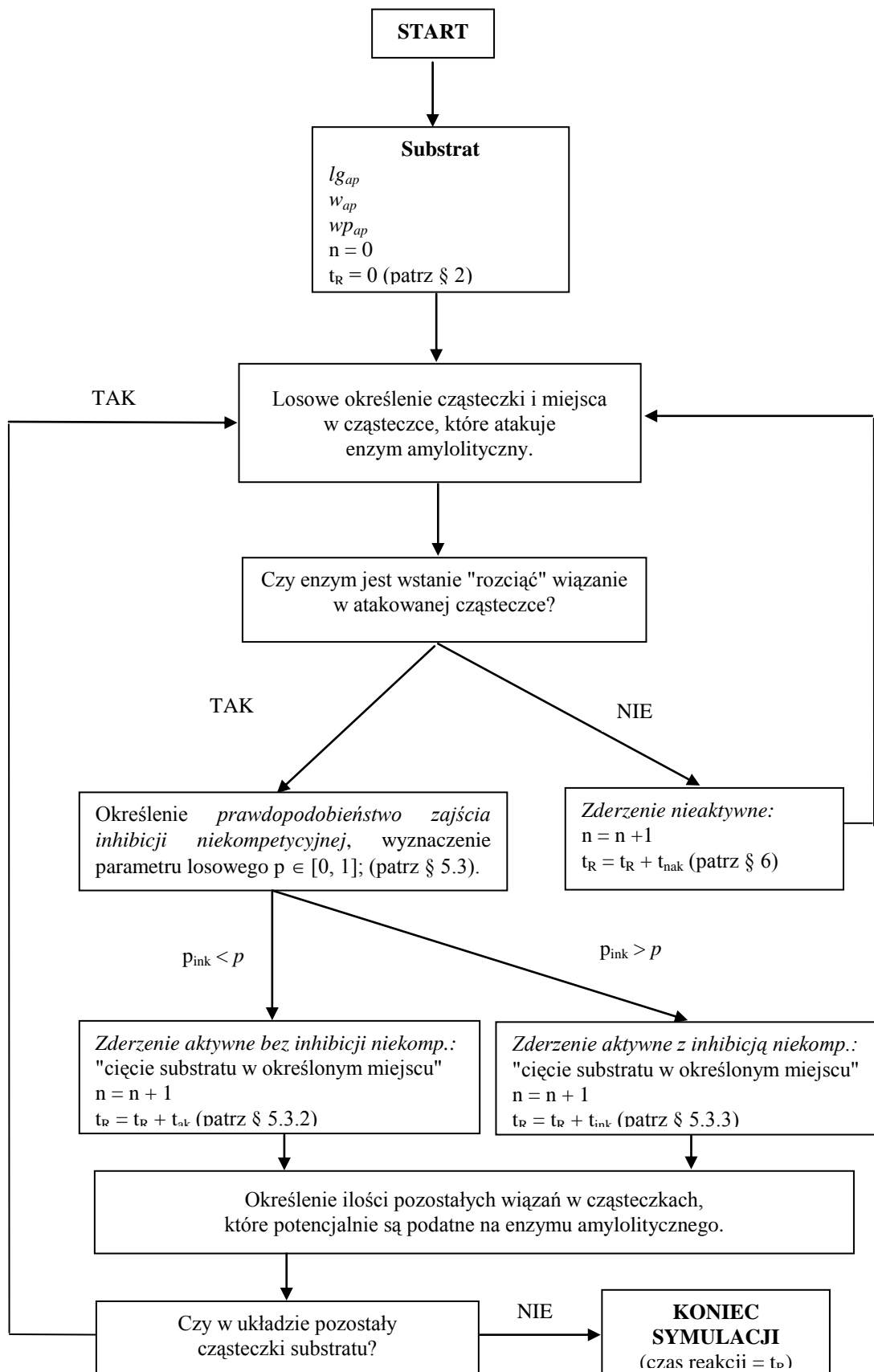
Na kolejnej stronie przedstawiono ogólny model uwzględniający inhibicję niekompetycyjną. Zaznaczone na schemacie symbolem § numery odwołań dotyczą przedstawionych powyżej modyfikacji modelu.

Przyłączenia cząsteczki inhibitora niekompetycyjnego wydłuża czas reakcji w porównaniu z procesem katalizowanym przez enzym wolny od obecności inhibitora, czyli: $t_{\text{ink}} > t_{\text{ak}}$. Jednakże istnieją cząsteczki (aktywatory), które powodują dodatkową aktywację enzymu: $t_{\text{ink}} < t_{\text{ak}}$. W opracowanym modelu symulowanie tego procesu sprowadza się od strony matematycznej do wyznaczenia wielkości parametru p_{ink} właściwie do konkretnego układu substrat-enzym-aktywator oraz przypisaniu parametrowi t_{ink} , zamiast czasu aktywnego zderzenia z inhibicją niekompetycyjną, czasu zderzenia aktywnego z aktywacją enzymu. Reasumując jeżeli cząsteczka enzymu związana jest z inhibitorem to czas pojedynczego zderzenia aktywnego ulega odpowiedniemu wydłużeniu, a jeżeli z aktywatorem to skróceniu,

w stosunku do czasu reakcji katalizowanej przez wolny enzym. Aktywatorem enzymu, może być nie tylko substancja chemiczna, ale także promieniowanie, np. mikrofalowe lub światło dostarczające do układu dodatkowej energii ułatwiającej lub umożliwiającej przebieg reakcji*. Przy opisie reakcji tego typu, uwidacznia się trafność przyjętego w modelu opisu reakcji, gdyż poprzez wprowadzoną stałą prawdopodobieństwa, możemy uwzględnić wpływ dodatkowych czynników.

* Enzym poprzez stabilizuje struktury odpowiadające stanowi pośredniemu reakcji obniża energię aktywacji reakcji (ΔG^\ddagger). Natomiast promieniowanie elektromagnetyczne może dostarczać energię, niezbędną do zajścia tej reakcji, a tym samym powodując, że reakcja jest termodynamicznie możliwa lub/i dodatkowo ją przyspieszając [19].

Hydroliza skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych z uwzględnieniem inhibicji niekompetycyjnej - schemat ogólny



2.6 Układy „wieloenzymatyczne”

Istotną cechą modelu jest możliwość rozpatrzenia układu zawierającego wiele cząsteczek danego enzymu lub cząsteczek różnych enzymów. Dodatkowo założono, że wszystkie cząsteczki enzymów w danej objętości jednostkowej, będą przez model rozróżnialne, co pozwoli na ewentualnie śledzenie „historii” enzymu.

W przeciwieństwie do wcześniej prezentowanych schematów zawierających pojedynczą cząsteczkę enzymu w objętości jednostkowej przyjęto, że zarówno liczba cząsteczek substratów, substratów pośrednich, produktów, jak i cząsteczek enzymu jest nieograniczona. Przy tworzeniu modelu, założono, że będzie mógł on opisywać układy, w których zmieniane jest w czasie nie tylko stężenie produktów i substratów, ale i enzymów [25].

Założenia opisujące rozszerzenia modelu do układu „wieloenzymatycznego” przedstawiono poniżej:

1. Istnieje możliwość rozpatrywania w modelu nieograniczonej liczby cząsteczek enzymu zawartych w objętości jednostkowej.
2. Każdej cząsteczce enzymu znajdującej się w objętości modelowej zostają przypisane następujące parametry:
 - 2.1. numer enzymu - e - będący kolejną liczbą całkowitą począwszy od jeden (wszystkie cząsteczki enzymu są ponumerowane),
 - 2.2. typ enzymu - określająca rodzaj danego enzymu (typ „cięcia”),
 - 2.3. czas t_e - parametr czasu wyznaczany dla danej cząsteczki enzymu.
3. W momencie rozpoczęcia reakcji wszystkie wartości parametrów t_e wynoszą zero.
4. O kolejności rozpatrywania zderzeń enzymów z innymi cząsteczkami, decyduje wartość wprowadzonego parametru t_e :
 - 4.1. rozpatrywane jest zderzenie enzymu, dla którego wartość parametru t_e jest najmniejsza,
 - 4.2. jeżeli dla kilku enzymów wartość parametru t_e jest identyczna, to rozpatrywany jest enzym o najmniej wielkości parametru e .
5. Po wyznaczeniu enzymu, symulowany jest akt jego pojedynczego zderzenia, według jednego z uprzednio przedstawionych schematów, opisującego zachowanie danego enzymu.
6. W przypadku, gdy enzym dokonał „cięcia” zostaje określona liczba miejsc podatnych na działanie poszczególnych enzymów.
7. Za koniec reakcji przyjmuje się iterację, w której w układzie nie występuje żadne wiązanie, podatne na atak któregośkolwiek z enzymów. Za czas reakcji t_R przyjmuje się największą wartość parametru t_e dla rozpatrywanych w układzie enzymów.
8. W pracy przyjęto, że zderzenia enzym-enzym nie będą rozpatrywane, co wynika z przyjętego na wstępie

założenia: $c_S \gg c_E$. Jednakże, istnieje prosta możliwość uwzględnienia także i tych zderzeń. Jeżeli w objętości jednostkowej występuje x podjednostek glukozy i y cząsteczek enzymu, to w przedstawionym w pracy modelu generowana jest w sposób losowy liczba z przedziału od jeden do x , określająca miejsce ataku enzymu na podjednostkę glukozy. Jeżeli natomiast wyznaczmy losowo liczbę z przedziału od 1 do wartości $x+y-1$. Jeżeli wyznaczona wartość jest liczbą z przedziału od jeden do x , to tak jak poprzednio odpowiada to zderzeniu enzymu z podjednostką glukozy, natomiast jeśli jest z przedziału od $x+1$ do $x+y-1$ to oznacza to zderzenie enzym-enzym.

Założmy, że w objętości jednostkowej rozpatrujemy pięć cząsteczek enzymów (trzy α -amylazy i po jednym β -amylazy i glukoamylazy). W celu lepszego zobrazowania przykładu przepisemy odpowiednim stałym czasowym wartości liczbowe charakteryzujące poszczególne enzymy*:

- ◇ α -amylaza: czas zderzenia aktywnego: $t_{a,ak} = 20$ [ns]; czas zderzenia nieaktywnego: $t_{a,nak} = 7$ [ns],
- ◇ β -amylaza: czas zderzenia aktywnego: $t_{b,ak} = 15$ [ns]; czas zderzenia nieaktywnego: $t_{b,nak} = 6$ [ns] oraz dodatkowo czas zderzenia nieaktywnego z inhibicją kompetycyjną maltozą: $t_{b,ik} = 30$ [ns]
- ◇ glukoamylaza: czas zderzenia aktywnego: $t_{g,ak} = 8$ [ns]; czas zderzenia nieaktywnego: $t_{g,nak} = 5$ [ns],

Cząsteczki enzymów zostały ponumerowane w następujący sposób: trzem cząsteczką α -amylazy zostały przypisane numery: 1, 2 i 3. β -amylazie numer 4, a glukoamylazie numer 5. Ponieważ na początku symulacji wartości wszystkich parametrów t_e wynoszą zero, o kolejności rozpatrywania poszczególnych zderzeń enzymów decyduje parametr e . Rozpatrzmy jak hipotetycznie może przebiegać proces hydrolizy polocukru w przedstawionym układzie według przedstawionego modelu:

- (0) W chwili rozpoczęcia symulacji, wartości parametru t_e dla wszystkich cząsteczek enzymu wynoszą zero (patrz § 3.).
- (1) Ponieważ wszystkie wartości t_e są sobie równe to zgodnie z § 3 jako pierwsza rozpatrywana jest cząsteczka enzymu o najniższej wartości parametru e . W przykładzie jest to α -amylaza₁. Zgodnie z § 5 symulowany jest akt pojedynczego zderzenia α -amylazy wg założeń odpowiedniego modelu (model hydrolizy skrobi przy udziale α -amylazy). Założmy, że doszło do zderzenia aktywnego, czas reakcji dla $e=1$, wynosi: $t_1 = t_1 + t_{ak} = 0 + 20 = 20$ [ns].
- (2) Podobnie jak w (1) rozpatrujemy zderzenia α -amylazy₂. Przyjmijmy, że i tym razem dochodzi do

* Podane tu wartości służą jedynie zilustrowaniu przykładu i nie są związane z konkretnym enzymem.

zderzenia aktywnego: $t_2 = t_2 + t_{ak} = 0 + 20 = 20$ [ns].

- (3) Rozpatrujemy trzecią cząsteczkę α -amylazy₃. Tym razem założmy, że doszło do zderzenia nieaktywnego: $t_3 = t_3 + t_{nak} = 0 + 7 = 7$ [ns].
- (4) Tym razem rozpatrywaną cząsteczką enzymu jest β -amylaza, jeśli doszło do zderzenia aktywnego to: $t_4 = t_4 + t_{ak} = 0 + 15 = 15$ [ns].
- (5) Ostatnią cząsteczką enzymu, dla której wartość parametru t_e jest równa zero jest glukoamylaza. Przyjmijmy, iż doszło do zderzenia nieaktywnego: $t_5 = t_5 + t_{nak} = 0 + 5 = 5$ [ns].
- (6) Zgodnie z § 4.1. rozpatrywane jest zderzenie enzymu, dla którego wartość parametru t_e jest najmniejsza. Ponieważ aktualne wartości parametrów t_e wynoszą: $t_1 = 20$; $t_2 = 20$; $t_3 = 7$; $t_4 = 15$ i $t_5 = 5$, najniższą wartość ma parametr t_e dla piątego enzymu, także ponownie rozpatrywany jest atak glukoamylazy. Założmy, że tym razem dochodzi do zderzenia aktywnego: $t_5 = t_5 + t_{ak} = 5 + 8 = 13$ [ns].
- (7) Tym razem, najniższą wartość parametru t_e ma α -amylaza₃. Jeśli dojdzie do zderzenia aktywnego to: $t_3 = t_3 + t_{ak} = 7 + 20 = 27$ [ns].
- (8) Rozpatrywany jest atak glukoamylazy, w przypadku zderzenia nieaktywnego: $t_5 = t_5 + t_{nak} = 13 + 5 = 18$ [ns].
- (9) W dziewiątej iteracji najniższą wartość parametr t_e przyjmuje dla β -amylazy. Założmy, że tym enzymem zaatakował cząsteczkę maltozy i doszło do inhibicji kompetycyjnej: $t_4 = t_4 + t_{nak} = 15 + 30 = 45$ [ns].
- (10) Kolejno, uwzględniając § 4.1. rozpatrujemy atak cząsteczki glukoamylazy, w przypadku zderzenia nieaktywnego: $t_5 = t_5 + t_{nak} = 18 + 5 = 23$ [ns].

W dalszej części rozpatrywane są zgodnie z § 4. Kolejne zderzenia enzymów, aż do zakończenia reakcji § 7. Rozpatrywany przykład dla pierwszych dziesięciu cykli symulacji przedstawiono w skróconej formie w poniższej Tabeli.

Tabela 3 Przykład symulacji układu zawierającego pięć cząsteczek enzymów. Literą Ξ oznaczono symbol zderzenia jakie jest rozpatrywane względem danej cząsteczki enzymu (**ak** - zderzenie aktywne; **nak** - zderzenie nieaktywne, **ik** - inhibicja kompetycyjna). Symbolem t oznaczono czasy dla poszczególnych enzymów.

Iteracja	α -amylaza ₁ (e=1)		α -amylaza ₂ (e=2)		α -amylaza ₃ (e=3)		β -amylaza ₄ (e=4)		γ -amylaza ₅ (e=5)	
	Ξ_1	t_1	Ξ_2	t_2	Ξ_3	t_3	Ξ_4	t_4	Ξ_5	t_5
0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
1	ak	0→20	-	0	-	0	-	0	-	0
2	-	20	ak	0→20	-	0	-	0	-	0
3	-	20	-	20	nak	0→7	-	0	-	0
4	-	20	-	20	-	7	ak	0→15	-	0
5	-	20	-	20	-	7	-	15	nak	0→5
6	-	20	-	20	-	7	-	15	ak	5→13
7	-	20	-	20	ak	7→27	-	15	-	13
8	-	20	-	20	-	28	-	15	nak	13→18
9	-	20	-	20	-	28	ik	15→45	-	18
10	-	20	-	20	-	28	-	45	nak	18→23

2.7 Modyfikacje modelu

Zaletą opracowanego modelu jest jego łatwa adaptacja oraz potencjalna możliwość rozbudowy i uwzględnienia dodatkowych zjawisk, które nie były rozpatrywane przy pierwotnym opracowywaniu modelu. Po opracowaniu i weryfikacji modelu przedstawionego w poprzedniej części pracy, podjęto próbę dalszej jego rozbudowy pozwalającej między innymi na modelowa symulację następujących zjawisk:

- ◆ inaktywacji enzymu,
- ◆ ataku wielokrotnego,
- ◆ transferazy,
- ◆ reakcji niespecyficzných,
- ◆ izomeryzacji, uwzględnienia warunków sferycznych,
- ◆ różnego powinowactwa enzymów do substratu,
- ◆ reakcji niespecyficzných,
- ◆ reakcji nieenzymatycznych przebiegających równolegle z procesami enzymatycznymi,
- ◆ warunku sferyczności ataku enzymu na substrat,
- ◆ energii aktywacji,
- ◆ gęstość (lepkość) mieszaniny reakcyjnej.

W dalszej części pracy przedstawiono modyfikacje modelu pozwalające na uwzględnienie powyższych zjawisk towarzyszących procesom enzymatycznej degradacji biopolimerów. Mogą być one stosowane łącznie lub rozdzielnie w zależności od specyfiki opisywanego układu.

2.7.1 Inaktywacja enzymu

Inaktywacja enzymu, zwana potocznie *starzeniem enzymu*, jest na ogół procesem niepożądanym, powodującym spadek szybkości katalizowanej reakcji. Przyczyną inaktywacji enzymu może być rozkład (degradacja) cząsteczek enzymów^{*}, ich modyfikacja powodująca zmniejszenie liczby obrotów lub inhibicja. Poniżej przedstawiono trzy modyfikacje

^{*} W celu zwiększenia odporności enzymów stosuje się wiele technik, np. pozyskiwane są nowe enzymy ze szczepów termofilnych lub wprowadza się modyfikacje zwiększające ich trwałość (np. poprzez wprowadzenie dodatkowych mostków disiarczkowych).

pozwalające na uwzględnienie inaktywacji enzymu. O wyborze konkretnego modelu powinno zdecydować występowanie konkretnych zjawisk w badanym układzie oraz możliwość wyznaczenia dodatkowych zmiennych.

2.7.2 Zmniejszenie liczby obrotów enzymu.

Spadek aktywności enzymu związany jest ze zmniejszeniem liczby obrotów enzymu, czyli wydłużeniem cyklu katalitycznego. Może być to spowodowane zarówno wydłużeniem czasu zderzeń aktywnych i nieaktywnych, co można zapisać: $[t_{ak}]_n \leq [t_{ak}]_{n+1}$ oraz/lub $[t_{nak}]_n \leq [t_{nak}]_{n+1}$. Istnieje dowolność przyjęcia opisu zmiany wielkość parametrów opisujących czas zderzenia aktywnego i nieaktywnego podczas reakcji, np. jako funkcję czasu reakcji: $t_{ak} = f(t_R) \therefore t_{nak} = g(t_R)$ lub formie stabilizowanej na podstawie pomiarów zmiany aktywności preparatu enzymatycznego.

Inaktywacja enzymu może być także wyrażona poprzez prawdopodobieństwo. W poprzedniej części pracy został wprowadzony parametr określony jako *prawdopodobieństwo zajścia reakcji enzymatycznej*. Można stwierdzić, że w miarę „starzenia się enzymu” prawdopodobieństwo zajścia reakcji enzymatycznej odpowiednio maleje. Co można zapisać wg przyjętej notacji: $[p]_n \leq [p]_{n+1}$.

W niektórych opracowaniach podaje się, że statystycznie jedna cząsteczka enzymu jest w stanie przeprowadzić określoną liczbę reakcji (cykli katalitycznych). W przypadku, gdy dysponujemy takimi danymi, możemy je uwzględnić wprowadzając dodatkowy parametr, określający ilość przeprowadzonych zderzeń aktywnych dla danej cząsteczki enzymu. Alternatywnie podawany jest *średni czas życia enzymu*.

2.7.3 Zderzenie „dead end”

W przypadku inhibicji nieodwracalnej inhibitor wiąże się w sposób nieodwracalny z enzymem powodując jego dezaktywację. W modelu możemy rozpatrywać zderzenia prowadzące do inhibicji nieodwracalnej według następujących zasad:

1. Liczba lg określa liczbę podjednostek glukozy w układzie.
2. Ilość cząsteczek inhibitora określa dodatkowy parametr li .
3. Każdorazowy określana jest liczba losowa z przedziału domkniętego od 1 do $lg+li$. Możliwe są dwa typy zderzeń:
 - 3.1. w przypadku gdy wyznaczona liczba jest z przedziału od 1 do lg symulowana jest zderzenie enzymu z cząsteczką substratu lub produktu według odpowiedniego modelu, właściwego dla

- danej reakcji enzymatycznej,
- 3.2. wyznaczenie liczby z przedziału od $lg+li$ do $lg+li$ odpowiada zderzeniu prowadzącemu do inhibicji nieodwracalnej (zderzenie „dead end”). Liczba cząsteczek enzymów w układzie maleje o jedność.
 4. Za koniec reakcji przyjmuje się iteracje, dla której w układzie nie występują cząsteczki substratu lub enzymu.

2.7.4 Zmiana stężeń

W opracowanym modelu możemy rozpatrywać zmianę stężeń substratów, produktów jak i enzymu. Modelowo odpowiada to zmiana ilości odpowiednich cząsteczek w rozpatrywanej objętości jednostkowej. Możemy rozpatrywać trzy przypadki:

2.7.4.1 Zmiana stężenia enzymu

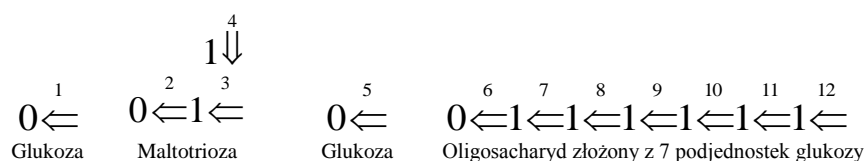
Opis układu, w którym zmianie ulega stężenie enzymu odbywa się analogicznie do opisanego wcześniej układu wieloenzymatycznego. Istotne jest to, iż w określonym przez użytkownika momencie możemy dowolnie zwiększyć lub zmniejszyć ilość danego enzymu lub wprowadzić do układu inny enzym. Możemy to prześledzić na przykładzie: chcemy dokonać konwersji skrobi do maltozy przy udziale α - i β -amylazy. Jeżeli enzymy są termolabilne to ekonomicznie opłacalne jest wstępne upłynnienie skrobi przy udziale α -amylazy, a następnie scukrzenie pod wpływem β -amylazy. Proces ten możemy prześledzić w układzie modelowym przeprowadzając symulacje w przedziale $t_0 \div t_x$ dla układu zawierającego wyłącznie α -amylazę, a następnie w chwili t_x wprowadzić dodatkowo cząsteczki β -amylazy. Aby zachować zgodność z przyjętymi założeniami dla modelu reakcji wieloenzymatycznej należy przyjąć, że wszystkie czasy t_e dla wprowadzonych β -amylaz będą równe t_x . Następnie w przedziale $t_x \div t_k$ rozpatrywany jest układ zawierający mieszaninę enzymów α - i β -amylazy.

2.7.4.2 Zmiana stężenia substratów, produktów i inhibitorów.

Do układu możemy wprowadzić podczas trwania procesu dodatkowa ilość cząsteczek, umożliwia to np. stwierdzenie w jakim stopniu zwiększy się szybkość reakcji po dodatkowym wprowadzeniu cząsteczek substratów lub czy i w jakim stopniu zostanie spowolniona reakcja w przypadku dodania do układu cząsteczek produktów lub inhibitora.

Obrazowo jeżeli chcemy do układu zawierającego lg podjednostek glukozy wprowadzić cząsteczkę amylopektyny złożoną z 100000 podjednostek glukozy oraz dziesięć cząsteczek maltozy, to parametr lg zostaje zwiększony o liczbę wprowadzanych podjednostek glukozy (w przykładzie $lg = lg + 100000 + 10 \cdot 2$), a łańcuchy opisujące funkcję charakterystyczną i strukturę połączeń zostają rozbudowane o zapis wprowadzonych cząsteczek.

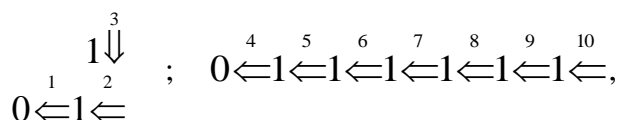
Nieco trudniejszym do zamodelowania jest proces usuwania cząsteczek. Załóżmy, że w objętości jednostkowej rozpatrujemy układ złożony z dwóch cząsteczek glukozy, izomaltotriony oraz oligosacharydu złożonego z 7 podjednostek glukozy:



według przyjętej w pracy notacji możemy zapisać układ jako:

$$\{\{0,0\};\{0,0\},\{1,4\},\{1,-3\};\{0,0\};\{0,0\},\{0,1\},\{0,1\},\{0,1\},\{0,1\},\{0,1\},\{0,1\}\}.$$

Przyjmijmy, że z układu usuwamy cząsteczki glukozy. Ponieważ w przyjętej objętości liczba cząsteczek wolnej glukozy wynosi dwa, to liczba podjednostek glukozy w układzie maleje z $lg = 12$ do wartości $lg = 10$. Zmianie (przesunięciu) ulegają także numery przypisane podjednostką w układzie:



co odpowiada zapisowi:

$$\{\{0,0\},\{1,3\},\{1,-2\};\{0,0\},\{0,1\},\{0,1\},\{0,1\},\{0,1\},\{0,1\},\{0,1\}\}.$$

Generalnie, procedurę usuwania cząsteczki z układu modelowego można zawrzeć procedurą:

1. Niech gl oznacza liczbę podjednostek glukozy w układzie, gx ilość podjednostek glukozy w usuwanej z układu cząsteczce, x numer pierwszej podjednostki glukozy w usuwanej cząsteczce.
2. Parametry przypisane podjednostką glukozy od 1 do $x-1$ pozostają bez zmian.
3. Parametry przypisane podjednostka glukozy od $x+gr-1$ do gl ulegają przesunięciu:
 - 3.1. wartości funkcji charakterystycznej zostają przepisane do komórek o wyznacznikach mniejszych o wartość x , w stosunku do wyznaczników pierwotnych. Wartości funkcji charakterystycznej pozostają bez zmian.
 - 3.2. wartości funkcji opisującej rozgałęzienia zostają przepisane do komórek o wyznacznikach

mniejszych o wartość x , w stosunku do wyznaczników pierwotnych, jednocześnie rozpatrywane są warunki:

- 3.2.1. gdy wartość funkcji wynosiła zero, nie ulega ona zmianie,
 - 3.2.2. gdy wartość funkcji była liczbą ujemną, dodaje się do niej wielkość x ,
 - 3.2.3. gdy wartość funkcji była liczbą dodatnią, odejmuje się od niej wielkość x
4. Ilość podjednostek glukozy w układzie maleje o wartość x : $gl = gl - x$.
 5. W przypadku usuwania większej ilości cząsteczek opisana procedura ulega powtórzeniu.

2.7.5 Reakcje nieenzymatyczne

Zmieniając stężenie cząsteczek substratu i produktu, możemy modelować w układzie zachodzenie procesów nieenzymatycznych przebiegający równolegle z modelowanymi procesami enzymatycznymi. Procesem takim może być rozkład biopolimeru pod wpływem światła lub napromieniowania cząsteczkami alfa. Przykładowo, w modelu możemy przyjąć że co jedną sekundę zrywane jest co tysięczne wiązanie α -1 \rightarrow 4-glikozydowe.

2.7.5.1. Reakcje kondensacji

Enzymatycznemu rozkładowi biopolimerów mogą towarzyszyć reakcje kondensacji. Przyczyną ich występowania może być zanieczyszczenie preparatu enzymatycznego śladowymi ilościami innych enzymów lub mogą być one procesami samorzutnymi. W przypadku opisywanej reakcji enzymatycznej degradacji skrobi, może być to reakcja kondensacji dwóch cząsteczek glukozy prowadząca do utworzenia izomaltozy lub kondensacja glukozy i maltozy z utworzeniem maltotriozy.

Ponieważ cząsteczki w przedstawionym modelu są zapisywane w formie łańcucha, przy rozpatrywaniu reakcji kondensacji konieczne może się okazać przesunięcie pewnej ilości elementów łańcucha w sposób zbliżony do opisanego w poprzednim rozdziale. Aby zilustrować to zagadnienie posłużmy się prezentowanym uprzednio przykładem.

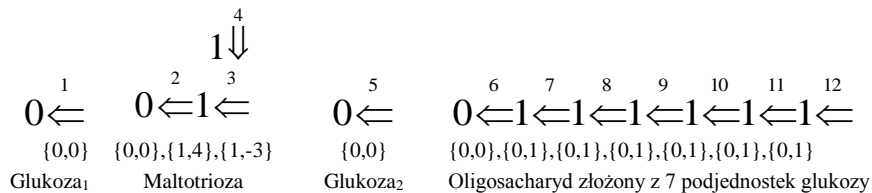
Tak jak poprzednio rozpatrzmy układ w którym zawarte są dwie cząsteczki glukozy, cząsteczka maltotriozy oraz oligosacharyd złożony z siedmiu podjednostek glukozy. Przyjmijmy, że zachodzi do kondensacji cząsteczek glukozy z utworzeniem maltozy. W układzie modelowym proces ten został podzielony na dwa etapy:

- ♦ etap przesunięcia - przyjęto że cząsteczka przyłączana poprzez wolne wiązanie α -1 \rightarrow 4 zostaje przesunięta w łańcuchu, w taki sposób aby znalazła się ona bezpośrednio za cząsteczką do której zostaje przyłączona. Odpowiedniemu przesunięciu w łańcuchu mogą

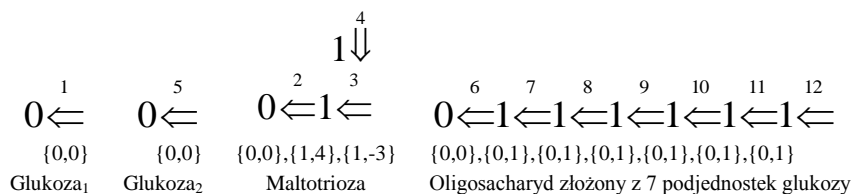
ulec pozostałe cząsteczki.

- ♦ etap kondensacji - odpowiada połączeniu cząsteczek.

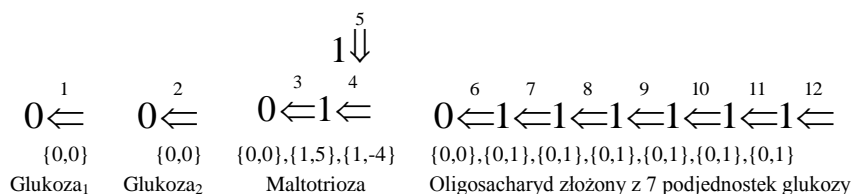
Opisany proces wyjaśnia poniższy przykład (dla zwiększenia czytelność etap pierwszy rozdzielono na dwa podetapy):



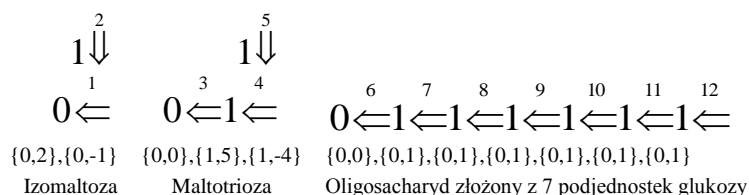
↓ (przesunięcie drugiej glukozy za glukozę pierwszą)



↓ (zmiana wartości funkcji połączeń w łańcuchu)



↓ (połączenie dwóch glukozy z utworzeniem izomaltozy)



1. Częsteczkami substratów są cząsteczki amylopektyny.
Dla amylopektyny ze skrobi ziemniaczanej przyjmuje się $lg_{ap} \sim 15000 \div 100000$.
Liczba rozpatrywanych cząsteczek substratu w modelu jest nieograniczona.
2. Przyjmuje się że czas reakcji w chwili rozpoczęcia symulacji wynosi zero: $t_R = 0$.
3. Końcowymi produktami reakcji są cząsteczki maltozy, maltotriozy i dekstryn granicznych.
4. Symulacja reakcji odbywa się w oparciu o losowe określenie miejsca ataku enzymu na cząsteczki zawarte w roztworze. W sposób losowy określana jest liczba z przedziału $1 \div lg_{calc}$, która w jednoznaczny sposób określa podjednostkę glukozy wraz cząsteczkę cukru w której się zawiera oraz wiązanie przy węglu C₁ w danej podjednostce. Jeśli doszło do zderzenia aktywnego (patrz § 4.1. oraz § 4.2.) to rozpatrywane jest prawdopodobieństwo zajścia ataku wielokrotnego:
 - 4.1. Prawdopodobieństwo ataku wielokrotnego określone jest liczbą rzeczywistą z przedziału domkniętego od zera do jeden: $p_w \in [0,1]$.
 - 4.2. Określany jest parametr pomocniczy p , będący każdorazowo wyznaczaną losowo liczbą rzeczywistą z przedziału domkniętego od zera do jeden:
 - 4.2.1. jeżeli $p_w = p$ to wartość p jest wyznaczana w sposób losowy ponownie do momentu do póki nie zajdzie warunek: $p_{iak} \neq p$,
 - 4.2.2. jeżeli $p_w < p$ to w przypadku gdy enzym jest w stanie dokonać kolejnego cięcia, zderzenie traktowane jest jako atak wielokrotny (patrz § 8.),
 - 4.2.3. jeżeli $p_w > p$ to w sposób losowy określana jest liczba z przedziału $1 \div lg_{calc}$, określająca kolejną podjednostkę glukozy atakowaną przez β -amylazę.
5. Rozpatrywane są następujące typy zderzeń:
 - 5.1. *aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę amylopektyny, w miejscu podatnym na działanie enzymu,
 - 5.2. *aktywne z atakiem wielokrotnym* - zachodzi w momencie, gdy w poprzedniej iteracji doszło do zderzenia aktywnego β -amylazy z substratem i enzym atakuje ponownie dany łańcuch w kolejnym miejscu podatnym na jego działanie,
 - 5.3. *nieaktywne* - kiedy enzym, atakuje cząsteczkę amylopektyny w miejscu niepodatnym na działanie β -amylazy lub enzym atakuje cząsteczkę produktu.
6. Miejscem podatnym na działanie β -amylazy są wiązania α -1 \rightarrow 4 między drugą i trzecią podjednostką glukozy w łańcuchu A, B lub C cząsteczki amylopektyny, licząc od końca nieredukującego. Hydrolizowane wiązanie musi być oddalone co najmniej o trzy podjednostki, licząc od punktu rozgałęzienia.
7. Ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylopektyny potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy wynosi:

$$wb_{ap} = \sum_{x=1}^y \frac{\text{Int}(w_{ap,x} - 2)}{2},$$

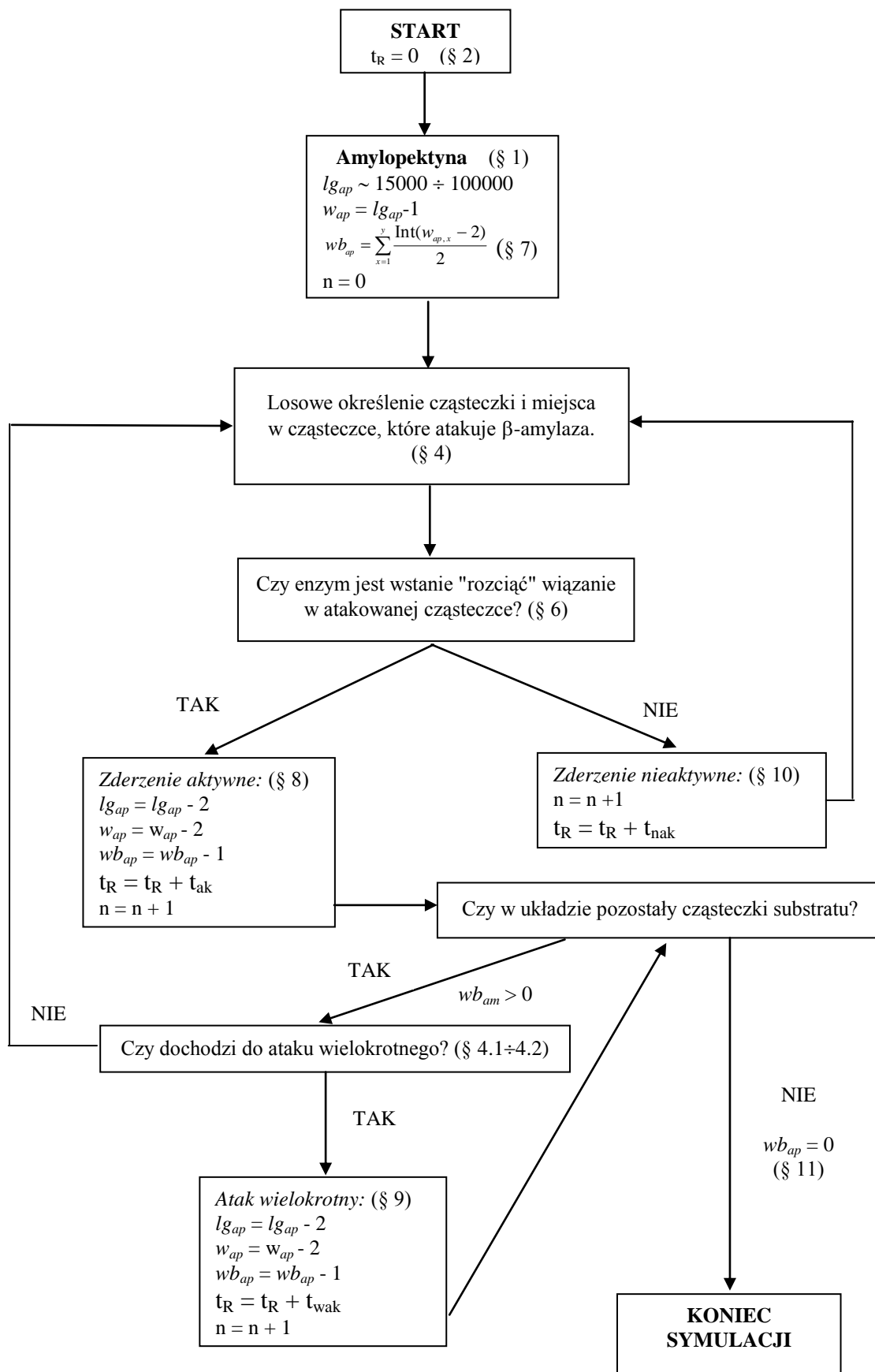
gdzie y jest ilością łańcuchów w cząsteczce amylopektyny, a x ilością podjednostek glukozy w danym łańcuchu licząc od końca nieredukującego do pierwszego miejsca rozgałęzienia.

8. W wyniku zderzenia aktywnego, od końca nieredukującego odcinana jest cząsteczka maltozy:
- 8.1. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylopektyny maleje o dwie:
 $[lg_{ap}]_n \Rightarrow [lg_{ap} - 2]_{n+1}$,
 - 8.2. ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylopektyny maleje o dwa:
 $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap} - 2]_{n+1}$,
 - 8.3. czas reakcji zwiększany jest o czas zderzenia aktywnego: $t_R = t_R + t_{ak}$,
 - 8.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
9. W wyniku zderzenia aktywnego z atakiem wielokrotnym, od końca nieredukującego odcinana jest cząsteczka maltozy:
- 9.1. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylopektyny maleje o dwie:
 $[lg_{ap}]_n \Rightarrow [lg_{ap} - 2]_{n+1}$,
 - 9.2. ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylopektyny maleje o dwa:
 $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap} - 2]_{n+1}$,
 - 9.3. czas reakcji zwiększany jest o czas zderzenia aktywnego z atakiem wielokrotnym: $t_R = t_R + t_{wak}$,
 - 9.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
10. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
- 10.1. liczba cząsteczek w układzie pozostaje bez zmian,
 - 10.2. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylopektyny pozostaje bez zmian: $[lg_{ap}]_n \Rightarrow [lg_{ap}]_{n+1}$,
 - 10.3. ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylopektyny pozostaje bez zmian:
 $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap}]_{n+1}$,
 - 10.4. czas reakcji zwiększany jest o czas zderzenia nieaktywnego: $t_R = t_R + t_{nak}$,
 - 10.5. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
11. Za koniec reakcji przyjmuje się najmniejszą iterację, dla której ilość wiązań α -1 \rightarrow 4, w cząsteczkach amylopektyny, potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy wynosi zero: $wb_{ap} = 0$.
12. Miarą postępu reakcji jest ilość końców redukujących uwalnianych podczas procesu hydrolizy amylopektyny przez β -amylazę.

Na sąsiedniej stronie przedstawiono schemat blokowy hydrolizy amylopektyny przy udziale β -amylazy. Symbolem *paragraf* - "\$" zaznaczono na schemacie blokowym odnośniki do powyższego tekstu.

Analogicznie może być rozpatrywany atak wielokrotny glukoamylazy, z tym, że zamiast maltozy uwalniane są cząsteczki glukozy.

Hydroliza amylopektyny przy udziale β -amylazy z uwzględnieniem ataku wielokrotnego - schemat blokowy.

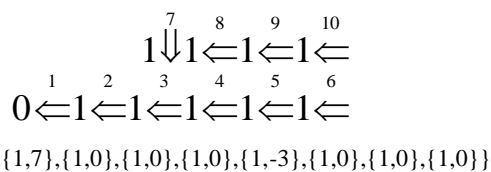


2.7.8 Powinowactwo enzymu do substratu

W dotychczasowych rozważaniach przyjęto, że prawdopodobieństwo zderzenia (ataku) enzymu ze wszystkimi podjednostkami glukozy w objętości modelowej jest takie samo lub w przypadku ataku wielokrotnego, wprowadzono zmienną określającą prawdopodobieństwo zajścia tego zjawiska. Można jednak wyobrazić sobie inny rozkład prawdopodobieństwa, przykładowo możemy przypuszczać że elementy skrajne amylopektyny (podjednostki glukozy leżące blisko końców łańcuchów) będą częściej atakowane, niż fragmenty leżące wewnątrz struktury cząsteczki.

W opracowanym modelu dla każdej iteracji określone jest w sposób losowy miejsce ataku enzymu. Jeżeli dysponujemy odpowiednimi danymi, możemy zmodyfikować model określając prawdopodobieństwo ataku enzymu na określoną podjednostkę glukozy np. poprzez podanie funkcji lub tablicy określającej odległość podjednostki od końca łańcucha i miejsc rozgałęzienia.

Rozpatrzmy następującą cząsteczkę amylopektyny złożoną z dziesięciu podjednostek glukozy:



standardowo w modelu założono jednakowe prawdopodobieństwo ataku enzymu na każdą podjednostkę glukozy^{*}, które w tym przypadku wynosi: 1/10:

$P_1 = 0,10 ; P_2 = 0,10 ; P_3 = 0,10 ; P_4 = 0,10 ; P_5 = 0,10 ; P_6 = 0,10 ; P_7 = 0,10 ; P_8 = 0,10 ; P_9 = 0,10 ; P_{10} = 0,10$,
 dodatkowo w przypadku nie rozpatrywania zderzeń enzymu z innymi cząsteczkami (np. z innymi enzymami w objętości reakcyjnej) założono, że suma wszystkich prawdopodobieństw ataku enzymu na podjednostki glukozy ma wartość jeden:

$$\sum_{x=1}^{10} p_x = 1.$$

Założmy jednak, że najbardziej prawdopodobny jest atak enzymu na dwie skrajnie położone podjednostki glukozy w każdym łańcuch, a prawdopodobieństwo ataku na punkt rozgałęzienia jest najniższe. W tym przypadku tablica rozkładu prawdopodobieństwa ataku

^{*} W pracy przyjęto, że prawdopodobieństwo będzie wyrażane liczbą rzeczywistą z przedziału domkniętego od zera do jedności: $p \in [0,1]$. W notacji z użyciem procentów, $p = 0,00$ odpowiada 0%, natomiast $p = 1,00$ odpowiada 100%.

enzymu na podjednostki glukozy w omawianej w przykładzie cząsteczki może wyglądać następująco:

$$P_1 = 0,15 ; P_2 = 0,10 ; P_3 = 0,04 ; P_4 = 0,07 ; P_5 = 0,10 ; P_6 = 0,15 ; P_7 = 0,07 ; P_8 = 0,07 ; P_9 = 0,10 ; P_{10} = 0,15 .$$

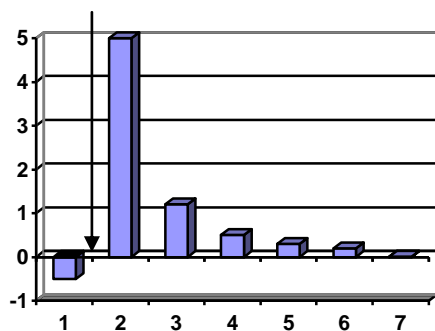
Podobnie, poprzez zróżnicowanie prawdopodobieństwa ataku enzymu na podjednostki glukozy w cząsteczce, możemy uwzględnić różne powinowactwo centrum wiążącego enzymu do fragmentu substratu [12]. Warto tu zaznaczyć, że powinowactwo to odgrywa kluczową rolę przy „przyłączeniu” się enzymu do fragmentu biopolimeru oraz że może ono ulec zmianie, np. przy dodaniu miejsc rozgałęzienia w okolice danego fragmentu. Rys.2.5. przedstawia przykładowe energie wiązania różnych enzymów amylolitycznych z podjednostkami glukozy w substracie.

2.7.9 Warunek sferyczny, energia aktywacji

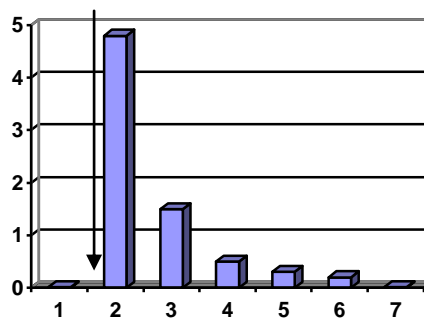
W pierwotnie opracowanym modelu założono, że każdy atak enzymu ma substrat w miejscu podatnym na działanie danego enzymu prowadzi do hydrolizy substratu w określonym miejscu (akt ten został określony w pracy jako *zderzenie aktywne*). W rzeczywistości nie każdy atak enzymu, na określone wiązanie w substracie podatne na działanie enzymu musi zakończyć się hydrolizą danego wiązania. Aby zaszedł proces „cięcia” enzym musi być spełniony warunek sferyczny, tzn. enzym musi „zaatakować cząsteczkę z odpowiedniej strony”, a układ enzym - substrat musi posiadać odpowiednią energię, równą lub wyższą od energii aktywacji [19].

Aby uwzględnić występowanie tych zjawisk, należy wprowadzić dodatkową zmienną określającą prawdopodobieństwo, że atak enzymu na miejsce podatne na jego działanie w cząsteczce substratu zakończy się hydrolizą określonego wiązania. W zależności od wyznaczonej zmiennej określające powyższe prawdopodobieństwo, wybierany jest jeden scenariusz wg którego zachodzi zderzenie:

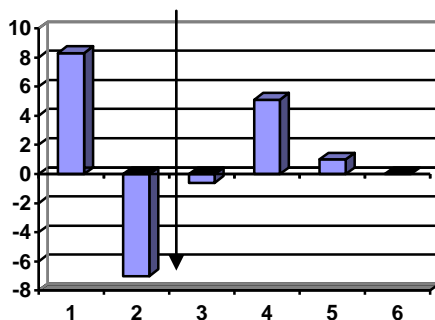
- zderzenie jest traktowane jako aktywne, z zachowaniem wszystkich warunków określonych w danym modelu,
- zderzenie jest traktowane jako nieaktywne, mimo iż enzym zaatakował cząsteczkę w miejscu potencjalnie podatnym na jego działanie.



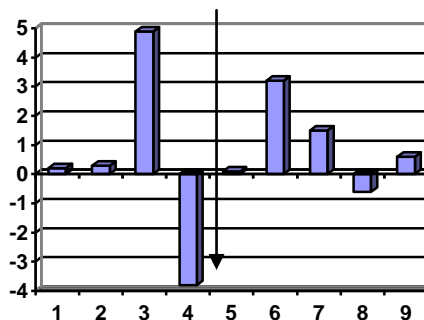
Glucoamylaza z *Rh. niveus* [67].



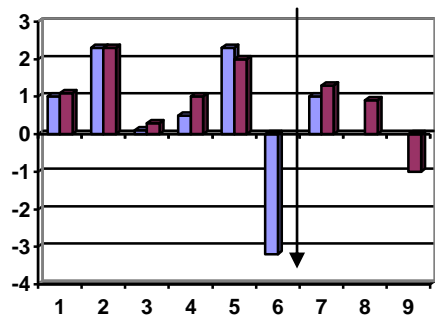
Glucoamylaza z *Rh. delemar* [68]



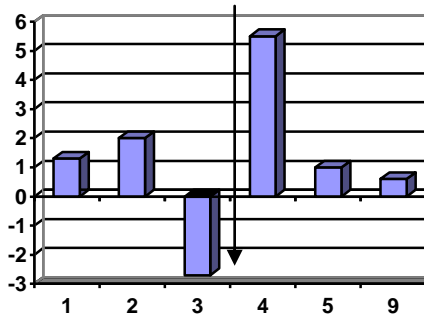
β -amylaza z ziaren soji [69].



Glucoamylaza z *Rh. delemar* [70]



Uplynniająca α -amylaza z *B. subtilis*.



Scukrzająca α -amylaza z *B. subtilis* [73].

Energia powinowactwa została wyznaczona w oparciu o metody kinetyczne [71] - kolor niebieski oraz w oparciu o analizę produktu [72] - kolor bordowy.

Rys. 2.5. Zestawienie energii powinowactwa centrum aktywnego dla różnych enzymów amylolitycznych [12]. Na osi odciętych zaznaczono numery podjednostek glukozy, z którymi wiąże się centrum katalityczne danego enzymu, na osi rzędnych przedstawiono energię powinowactwa A_i [kcal/mol]. Strzałkami zaznaczono hydrolizowane wiązanie w substracie.

2.7.10 Reakcje niespecyficzne

W przypadku reakcji enzymatycznych dopuszcza się, że niektóre enzymy są w stanie dokonać hydrolizy wiązań, także w miejscach powinny być odporne na ich działanie. Przykładowo raportuje się, że w przypadku hydrolizy skrobi przy udziale β -amylazy, na 6000 cząsteczek powstającej maltozy, uwalniana jest jedna cząsteczka glukozy. W praktyce jednak trudno określić, czy jest to wynik działania samego enzymu, jego zanieczyszczenia śladowymi ilościami innego enzymu, czy jest to wynik przemiany nieenzymatycznej. Niemniej w układzie modelowym, możemy dopuścić, że dany enzym jest w stanie dokonać „cięć niespecyficznych”. Na przykład możemy przyjąć, że 99,995% rozpatrywanych zderzeń nieaktywnych opisywanych jest zgodnie ze przyjętymi wcześniej założeniami, a pozostałe 0,005%, pomimo iż enzym atakuje cząsteczkę w miejscu określonym za odporne na jego działanie, to jednak dochodzi do aktu hydrolizy biopolimeru w danym miejscu.

2.7.11 Inhibicja substratowa, gęstość mieszaniny.

Zgodnie z intuicją zwiększanie stężenia substratu w układzie powinno spowodować zwiększenie szybkości reakcji lub w przypadku pełnego wysycenia enzymu substratem nie powodować zmiany prędkości reakcji. Jednakże w przypadku niektórych reakcji, paradoksalnie obserwuje się spadek szybkości reakcji przy zwiększeniu stężenia substratu. Zjawisko to nosi nazwę inhibicji substratowej.

Podobne zjawisko zaobserwowano przy badaniu kinetyki reakcji enzymatycznej degradacji skrobi przy udziale α -amylazy [74]. Przy jednakowym stężeniu enzymu, przy zwiększaniu stężenia substratu od 0,01 do 5% wagowych obserwowano liniowy wzrost prędkości reakcji. Jednakże przy stężeniu 10% wagowych skrobi obserwowana liniowość ulegała załamaniu, co można przypisać ujawnieniu się przy tym stężeniu oporów dyfuzyjnych.

Bazując na teorii zderzeń możemy przypuszczać, że w roztworze o większej lepkości, ruchy cząsteczek ulegną spowolnieniu, a tym samym wydłużeniu ulegają czasy zderzeń aktywnych i nieaktywnych. Odpowiada to przy zmianie lepkości układu, wyznaczeniu nowych wielkości parametrów t_{ak} i t_{nak} . W przypadku gdy dysponujemy odpowiednimi danymi, możliwe jest także wyznaczenie odpowiednich funkcji opisujących czas zderzeń:

◇ w przypadku wystąpienia inhibicji substratowej, czasy zderzeń są funkcjami stężeń substratów: $t_{ak} = f(c_s) \therefore t_{nak} = g(c_s)$,

- ◇ w przypadku gdy prędkość reakcji zależy od gęstości mieszaniny reakcyjnej, można przyjąć, że czasy zderzeń są funkcjami stężeń substratów i produktów: $t_{ak} = f'(c_S, c_P) \therefore$
 $t_{nak} = g'(c_S, c_P)$.

2.8 Podsumowanie

Ze względu na złożony charakter reakcji zaproponowano nowatorski sposób opisu kinetyki reakcji przyjmując, że substratem jest wiązanie podatne na działanie enzymu, a nie sama cząsteczka substratu. Jest to o tyle ważne, iż przy klasycznym opisie reakcji hydrolizy skrobi np. przy udziale α -amylazy, paradoksalnie stężenie masowe substratu (rozumianego jako ilość cząsteczek w układzie mogących potencjalnie ulec hydrolizie w wyniku oddziaływania z cząsteczkami enzymów), w pierwszym etapie reakcji jest stałe, a stężenie molowe rośnie!

Założenia opisanego modelu opisującego inhibicję kompetycyjną zostały przedstawione w artykule „*Iteration Model of Starch Hydrolysis by Amylolytic Enzymes*” [25]*. Pozostałe założenia i modyfikacje modelu były także prezentowane w pracach [77, 78] oraz na konferencjach ogólnopolskich i międzynarodowych [75, 76, 79, 90]†. Jak szczegółowo pokazano, model iteracyjny został tak skonstruowany, aby była możliwa jego adaptacja do określonego przebiegu reakcji oraz aby umożliwiał on uwzględnienie dodatkowych zjawisk i czynników fizycznych wpływających na przebieg procesu. Przykładowo przedstawiona w pracy koncepcja została podchwyciona przez Tamarę Basseling i współpracowników, którzy do modelu iteracyjnego wprowadzili m. in. czas dezaktywacji enzymu [26].

* W oparciu o bazę danych zawierającą wyniki eksperymentalne oraz szereg modeli opisujących kinetykę procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi stworzono także algorytm fuzzy logic [75]. W uproszczeniu składa się on z szeregu powiązanych ze sobą warunków „jeżeli ... to ... w przeciwnym razie ...”, określających przydatność oraz stopień dokładności (*poziom ufności*) poszczególnych modeli do opisu procesu degradacji skrobi w zależności od dostępności i zakresu poszczególnych parametrów kinetycznych [76].

† W cytowanych pracach podjęto także tematykę immobilizacji amylaz na nośnikach akrylowych oraz polianilinie [80], co stanowi swoiste połączenie tematu omawianego w pierwszym rozdziale z opisywanym zagadnieniem. Warto podkreślić, że immobilizacja enzymów podwyższa ich stabilność oraz znacząco podnosi efektywność procesów technologicznych [66, 81, 82].

2.9 Modelowanie reakcji bioakumulacji jonów Cr(III) z wykorzystaniem niebieskozielonych alg *Spirulina sp.*

Uzdatnianie ścieków oraz usuwanie zanieczyszczeń zawierających szkodliwe dla środowiska metale ciężkie, jest jednym z pierwszoplanowych zagadnień związanych z ochroną środowiska we współczesnym zindustrializowanym świecie [84]. Pod względem ilości uwalnianych do środowiska ilości metali ciężkich, główne źródła zanieczyszczenia metalami ciężkimi pochodzą przede wszystkim z przemysłu chemicznego, energetycznego, motoryzacyjnego, papierniczego, rafinerii ropy naftowej, zakładów hutniczych i kopalń oraz galwanizerni, firm farbiarskich i garbarstwa. Wymogi ochrony środowiska oraz względy ekonomiczne spowodowały, iż poszukuje się nowych, wydajnych oraz przyjaznych dla środowiska metod usuwania wspomnianych zanieczyszczeń [85]. Jedną z bardziej obiecujących i intensywnie badanych metod jest zastosowanie mikroorganizmów, zwłaszcza alg^{*}, jako biosorbentów metali ciężkich [86, 87, 88, 89]. Koncepcja ta zasługuje na szczególną uwagę, ze względu na biologiczne pochodzenie sorbenta, odnawialność jego zasobów, dużą pojemność biosorpcyjną względem metali ciężkich oraz na znacznie mniejsze koszty jego pozyskiwania w stosunku do membran filtracyjnych, bądź jonitów [90]. Mikroorganizmy wykorzystywane są także do ługowania metali z pozabilansowych rud, ścieków, osadów, koncentratów i odpadów poprodukcyjnych w biohydrometalurgii. Warto podkreślić, iż w przeciwieństwie do metod konwencjonalnych, biosorpcji nie dotyczą ograniczenia ekonomiczne, wynikające z niskiego stężenia metali ciężkich w roztworze. Ponadto usuwanie metali ze ścieków z udziałem mikroorganizmów jest procesem stosunkowo szybkim i efektywnym [91]. Badania kinetyki reakcji pokazały, iż biosorpcja 85–90% całej ilości usuniętego metalu następuje w czasie 10–15 minut, z czego znaczna ilość wiązana była w czasie kilku sekund [92].

Jako układ modelowy przedstawiono model wykorzystania cyjanobakterii *Spirulina sp.* do oczyszczania ścieków z jonów chromianowych (III). Wybór alg *Spirulina sp.*, jako biosorbenta, podyktowany był ich wysoką zdolnością adaptacyjną do zmieniających się warunków abiotycznych oraz ponadprzeciętną odpornością na zanieczyszczenia środowiska, w tym na obecność jonów chromianowych [93]. Algi *Spirulina sp.* to tani, szybko

^{*} Algi, glony (łac. *Algae*, gr. *Phykos*) są grupą organizmów fotoautotroficznych, należących do kilku odrębnych królestw (roślin, protistów i bakterii). Omawiane w rozdziale algi *Spirulina sp.* są cyjanobakteriami (sinicami) należącymi do rzędu *Oscillatoriales*.

zwiększający biomasę surowiec i odnawialny biosorbent. Biouzuwanie metali ciężkich odbywa głównie dzięki rozwiniętej powierzchni właściwej oraz możliwości wprowadzania jonów do wnętrza komórki, co dodatkowo podnosi pojemność biosorpcyjną* [93, 94]. Co istotne dla procesów biotechnologicznych, w przypadku alg nie występuje konieczność utrzymania podwyższonych warunków sterylnych oraz zaspokojenia specjalnych wymagań pokarmowych. Dodatkowym atutem wykorzystania alg w procesach oczyszczania ścieków jest możliwość degradacji zanieczyszczeń organicznych oraz usuwania związków azotu i fosforu [95, 96]. Jak pokazano, zużyty biosorbent może być utylizowany w procesie spalania z wytworzeniem dodatkowej energii, a metale mogą być odzyskane z popiołów [97].

Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 28 stycznia 2009 roku w sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu ścieków do wód lub ziemi, oraz w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego określa dopuszczalne stężenie chromu na poziomie 0,5-1,0 mg/dm³ [85]. Należy podkreślić, iż zawartość w diecie chromu(III) na poziomie 50-200 µg/dzień jest korzystna dla osoby dorosłej [98, 99][†], jednak już 10-krotne przekroczenie tej wartości może indukować procesy rakotwórcze w organizmie. Chrom III wchodzi w skład czynnika tolerancji glukozy GTF (*GLUCOSE TOLERANCE FACTOR*) wpływając na wiele procesów organicznych. Poprzez oddziaływanie z miejscem aktywnym cząsteczki insuliny może on regulować metabolizm tłuszczów, białek i glukozy, [100, 101].

Sam opis kinetyki biosorpcji Cr(III) jest niezwykle istotny, ponieważ pozwala oszacować czas i ilość biosorbentu potrzebnego do redukcji stężenia metalu do poziomu uznanego za bezpieczny dla człowieka i środowiska. Prezentowane zagadnienie uznano za szczególnie interesujące, gdyż proces biosorpcji chromu(III) jest istotnym zagadnieniem nie tylko związanym z oczyszczaniem ścieków. Paradoksalnie biomasę alg zawierającą standaryzowaną ilość chromu(III) można wykorzystać też, jako substrat przy produkcji leków i suplementów diety[‡]. Nowatorskim rozwiązaniem jest wykorzystanie biosorpcji do wytwarzania biologicznych dodatków paszowych z użyciem alg *Spirulina* sp. w celu zwiększenia przyswajalności takich mikroelementów jak chrom(III) [103-107].

* Równoległe z bioakumulacją metali ciężkich może dochodzić do procesu strącania wodorotlenków. Sprzyja temu silna alkalizacja mikrośrodowiska w bezpośrednim sąsiedztwie *Spiruliny* sp., będą konsekwencją prowadzonych procesów metabolicznych [97].

[†] Dzięki małej szybkości wiązania z ligandami, Cr(III) określany jest jako znacznie mniej toksyczny np. od Cr^{IV}O₄²⁻ [102].

[‡] Przykładowo preparat „*Chrom + B3 NATURKAPS*” produkowany przez wrocławski HASCO-LEK opisywany jest jako środek wspomagający odchudzanie i ograniczający apatyt (dzienna dawka zawiera 40 µg Cr(III) w postaci chlorku chromu).

2.10 Materiały i metody

W badaniach wykorzystano niebieskozielone algi *Spirulina sp.*, zakupione w firmie Sigma (USA) i hodowane w fotoreaktorze [108] o objętości 1 dm³ w temperaturze 35°C na pożywce zawierającej (g L⁻¹): NaNO₃, 2,50; K₂HPO₄, 0,50; NaHCO₃, 10,00; NaCl, 1,00; MgSO₄·7 H₂O, 0,2; CaCl₂·2 H₂O, 0,02; FeSO₄·7 H₂O, 0,01 [109] wzbogaconą glukozą 1,00 oraz jonami Cr(III) (3,1-25,6 mg kg⁻¹) przy oświetleniu (32,7 W m⁻²) włączanym periodycznie na 12 godzin i wyłączanym na 12 godzin. Stężenie komórek mierzono na spektrofotometrze Shimadzy UV-160A UV-visible przy długości fali 560 nm*. Intensywność światła określono przy pomocy luksometru PU 550 Metro Blansko. Stężenie jonów Cr(III) zmierzono na spektrometrze plazmowym Philips Scientific PU 7000. Szczegółowy opis pomiarów analitycznych, pozwalający na określenie ilości jonów chromianowych(III) zaabsorbowanych w procesie pasywnym i aktywnym bioakumulacji przedstawiono w [94, 110].

Parametry pierwszego z prezentowanych modeli zostały wyznaczone w programie *Mathematica* firmy Wolfram Research, Inc. Sztuczna sieć neuronowa została utworzona w programie MATLAB ver. 7.2 firmy MathWorks, Inc. [111].

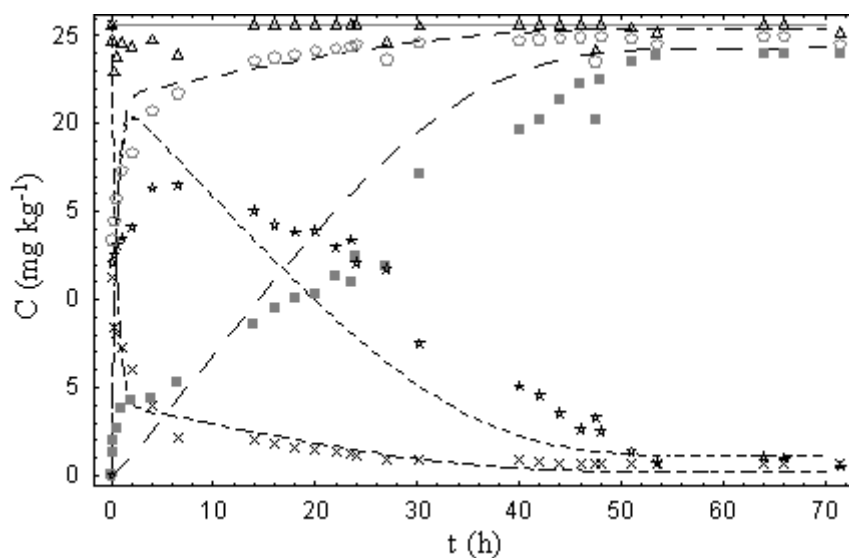
2.11 Mechanizm bioakumulacji

Pierwszy etap bioakumulacji związany jest z procesem wiązania jonów metalu do powierzchni komórki. Mechanizm ten jest identyczny z biosorpcją. W niniejszej pracy nazwano go *pasywnym* etapem bioakumulacji, ponieważ w procesie tym nie jest wymagana aktywność biologiczna komórek[†]. Następnie jony metalu transportowane są do wnętrza komórki. Etap ten wymaga nakładu energii i został określony jako *aktywny* etap bioakumulacji, ze względu na wymaganą aktywność biologiczną komórki. Ponieważ etap aktywny związany jest z kilkoma procesami jak aktywny transport przez błonę komórkową, wzrostem komórki oraz syntezą białek wiążących jony metalu, jest on znacznie wolniejszy od biosorpcji - pierwszego etapu bioakumulacji.

* Wybrana długość fali zapewniła niezależność wyników pomiaru od stężenia pigmentu w algach *Spirulina sp.*

† *De facto* opis biosorpcji na komórkach żywych jest identyczny z opisem procesu na komórkach martwych. Z tego względu jako biosorbenty wykorzystuje się także martwe komórki, bądź np. skorupki jaj [112], lub kości [113]. Na ogół jednak martwe komórki mają mniejszą pojemność biosorpcyjną oraz wiążą metal w sposób odwracalny [92].

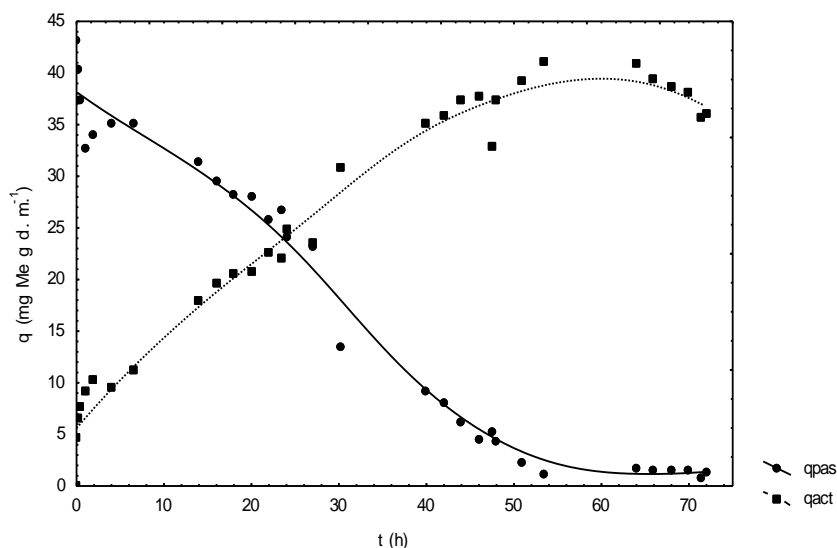
W celu potwierdzenia hipotezy związanej z dwuetapowym przebiegiem procesu bioakumulacji, zastosowano metodykę pomiarów, pozwalającą na rozróżnieniu ilości jonów metalu zaabsorbowanego na powierzchni komórki od ilości jonów chromianowych wprowadzonych do komórek *Spirulina sp.* Przyjęto, że jony chromianowe(III) związane są pasywnym procesie biosorpcji w sposób odwracalny i mogą być uwolnione po przemyciu roztworem HNO_3 o stężeniu $0,1 \text{ mol/dm}^3$. Natomiast jony metalu związane w sposób „nieodwracalny”, które w procesie aktywnym zostały wprowadzone do wnętrza komórek, nie podlegają elucji kwasem azotowym. Zgodnie z wynikami pomiarów, proces biosorpcji, którym następuje odwracalne przyłączenie jonów chromianowych do powierzchni komórki, jest stosunkowo szybki i osiąga on poziom równowagi w ciągu kilku minut [94]. W dalszym etapie przez kolejne 7 godzin obserwowany jest tylko nieznaczny wzrost stężenia jonów chromianowych zaabsorbowanych w sposób odwracalny. Po tym okresie następuje spadek stężenia jonów chromianowych związanych z powierzchnią komórki (rys. 2.6), co związane jest z procesami metabolicznymi i wprowadzaniem jonów metalu do wnętrza komórki na drodze aktywnej bioakumulacji. Stężenie jonów chromianowych związanych w sposób odwracalny spada do poziomu 2 mg/kg po 55 godzinach. Jednocześnie stężenie metalu wprowadzanego do komórek rośnie przez pierwsze 55 godzin trwania procesu. Po tym okresie monitorowane stężenia jonów Cr(III) osiągają poziom stały zgodnie z rysunkiem 2.6.



Rys. 2.6. Profil stężenia jonów chromianowych(III) podczas bioakumulacji.

- ✕ - c_{Me} (stężenie jonów chromianowych w roztworze), *
- ✱ - c_{pas} (jony chromianowe związane w pasywnym procesie biosorpcji), ■ - C_{act} (jony chromianowe związane w aktywnym procesie bioakumulacji),
- - $c_{pas}+c_{act}$ (całkowite stężenie jonów metalu związanego z biomasa), Δ - $c_{Me}+c_{pas}+c_{act}$ (całkowite stężenie jonów chromianowych w roztworze oraz jonów związanych z biomasa).

Jak wspomniano wiązanie jonów metalu do powierzchni komórki jest procesem stosunkowo szybkim, natomiast wprowadzanie jonów chromianowych do wnętrza komórki odbywa się znacznie wolniej i następuje dopiero po około 7 godzinach trwania procesu, wraz ze wzrostem mikroorganizmów. Należy też podkreślić, iż większość jonów chromianowych absorbowana jest z roztworu przez algi *Spirulina sp.* podczas pierwszych kilku minut trwania procesu (rysunek 2.7).



Rys. 2.7 Zmiana stężenia jonów chromianowych w pasywnym (q_{pas}) i aktywnym (q_{act}) etapie bioakumulacji.

Przeprowadzone eksperymenty potwierdziły przedstawiony mechanizm bioakumulacji przebiegający w etapach:

1. *etap pasywny* (biosorpcja) – etap o szybkim przebiegu [114], w którym jony metalu łączą się do powierzchni mikroalg (‘pasywna pojemność’),
2. *etap aktywny* (właściwa bioakumulacja) – etap trwający kilkadziesiąt godzin, podczas którego jony metalu transportowane są do wnętrza komórki (‘aktywna pojemność’). W warunkach eksperymentu większość jonów chromianowych była usuwana z powierzchni komórek i transportowana do ich wnętrza w czasie około 55 godzin.

Zgodnie z powyższym przyjęto, proces pasywnej biosorpcji zachodzi w podobny sposób zarówno na powierzchni żywych, jak i martwych mikroalg, natomiast proces aktywny mogą przeprowadzać wyłącznie żywe komórki alg.

2.12 Model kinetyczny

2.12.1 Model fizyczny

Proces biocorpcji przebiega sekwencyjnie w kilku etapach o różnej naturze biochemicznej. Ze względu na transport masy można wyróżnić: etap związany z pasywną sorpcją na powierzchni komórek, etap związany z transportem masy poprzez błonę komórkową do wnętrza komórek oraz akumulację jonów metalu wewnątrz alg.

Podczas pierwszego etapu, jony metalu obecne w roztworze są odwracalnie wiązane z wolną powierzchnią biomasy. Równowaga pomiędzy stężeniem jonów metalu w roztworze nad powierzchnią komórek c_{Me} a stężeniem metalu zaabsorbowanego na powierzchni komórki c_{pas} może być wyrażone poprzez równanie Langmuira [115-117]:

$$q = \frac{q_{max} \cdot c_{Me}}{1 + b \cdot c_{Me}} \quad (1)$$

Dla niskiego stężenia jonów metalu, powyższe równanie może być uproszczone do liniowej zależności:

$$c_{Me} = a \cdot c_{pas}, \quad (2)$$

gdzie a jest bezwymiarowym współczynnikiem absorpcji.

W drugim etapie procesu, jony metalu zaabsorbowane na powierzchni komórki, po związaniu z miejscami receptorowymi białek transportowych przenoszone są przez błonę komórkową. Po przeniesieniu przez membranę, jony metalu uwalniane są do cytoplazmy oraz/lub są wiązane z białkami i transportowane do organelli komórkowych, gdzie są akumulowane. Przedstawiony mechanizm bioakumulacji, może być opisany poprzez poniższy szereg reakcji równowagowych:



Do opisu kinetyki procesu bioakumulacji konieczne jest także uwzględnienie zmiany stężenia komórek alg w czasie trwania procesu*. Przyrost komórek w przypadku ograniczonego stężenia substratów, opisywany jest przez równanie Monoda:

* Najczęściej przyjmuje się, iż jony metalu absorbowane są przez żyjące komórki w których wzrost komórek jest zahamowany lub komórki są w fazie liniowego, bądź logarytmicznego wzrostu.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (4)$$

gdzie X jest stężeniem mikroorganizmów, a μ jest współczynnikiem określającym szybkość wzrostu komórek. Gdy substancje odżywcze dla komórek są limitowane, szybkość wzrostu może być wyrażona jako:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \quad (5)$$

gdzie μ_{\max} odpowiada maksymalnemu przyrostowi komórek, K_S jest stałą nasycenia oraz S odpowiada stężeniu substratu (substancji odżywczych).

Określenie charakteru zmian przyrostu biomasy jest ważne, gdyż szybkość procesu sorpcji jest proporcjonalna do powierzchni komórek, a akumulacja wewnątrz komórek jest proporcjonalna do ich objętości. Dodatkowo należy podkreślić, że jony metalu mogą mieć istotny wpływ na wzrost komurek, stymulując go lub powodując jego zahamowanie.

Przy opisie matematycznym procesów mikrobiologicznych, powszechną praktyką jest redukcja liczby parametrów modelu. Ponieważ bioakumulacja jest związana z dwoma procesami *de facto* zachodzącymi wewnątrz komórki (aktywnym transportem poprzez błonę komórkową i akumulacją jonów chromianowych w cytoplazmie przy udziale specyficznych białek), przyjęto iż szybkość tego procesu może być w prosty sposób opisana poprzez stała szybkości transportu aktywnego k_{act} :



Dla wyznaczenia parametrów powyższego modelu, konieczne było określenie, jaka część jonów chromianowych została (odwracalnie) zaabsorbowana na powierzchni komórki, a jaka została wprowadzona do jej wnętrza. W celu wyznaczenia tych wartości komórki alg były przemywane roztworem $0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ HNO}_3$ (wyznaczenie ilości jonów zaabsorbowanych na powierzchni komórki) oraz stężonym kwasem azotowym (określenie ilości jonów związanych odwracalnie i nieodwracalnie z biomasą).

Zaproponowany model uściślono określając eksperymentalnie, który z zaproponowanych etapów reakcji jest odwracalny, a których jest nieodwracalny. W tym celu komórki alg były przemywane roztworem $0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ HNO}_3$ (wyznaczenie ilości jonów zaabsorbowanych w sposób odwracalny) oraz stężonym kwasem azotowym (określenie ilości jonów związanych odwracalnie i nieodwracalnie z biomasą). Na podstawie pomiarów

i bilansu masy potwierdzono, iż proces przyłączania jonów metalu do powierzchni komórek (absorpcja) jest procesem odwracalnym, w czego konsekwencji można przyjąć iż $k_{pas} \gg k_{act}$ [94].

Dla hipotetycznego przypadku, w którym wszystkie jony Cr(III) zostają usunięte z roztworu, można przyjąć, że proces bioakumulacji jest nieodwracalny i nierównowagowy a wartość parametru k_{act} wynosi zero. Zgodnie w powyższym reakcja bioakumulacji może być wyrażona równaniem:



Jak przyjęto poprzednio, biosorpcja jonów Cr(III) jest pierwszym etapem bioakumulacji i może być wyrażona poprzez równanie Langmuira [115]:

$$q = \frac{2,22 \cdot c_{Me}}{1 + 1,62 \cdot c_{Me}} \quad (8)$$

Na podstawie obserwacji mikroskopowych stwierdzono, że podczas wzrostu komórek, stosunek biomasy do powierzchni komórek jest stały. Zgodnie z powyższym, bilans masy oraz kinetykę opisującą zmianę stężenia wyróżnionych form jonów chromianowych, można wyrazić równaniami:

$$c_{Me}(t) + c_{pas}(t) + c_{akt}(t) = c_{Me}(t=0) \quad (9)$$

$$\frac{dc_{Me}}{dt} = -k_{pas} \cdot X(t) \cdot c_{Me}(t) + k_{-pas} \cdot X(t) \cdot c_{pas}(t) \quad (10)$$

$$\frac{dc_{pas}}{dt} = k_{pas} \cdot X(t) \cdot c_{Me}(t) - k_{-pas} \cdot X(t) \cdot c_{pas}(t) - k_{act} \cdot X(t) \cdot c_{pas}(t) + k_{-act} \cdot X(t) \cdot c_{act} \quad (11)$$

$$\frac{dc_{akt}}{dt} = k_{act} \cdot X(t) \cdot c_{pas}(t) - k_{-act} \cdot X(t) \cdot c_{act} \quad (12)$$

Wzrost komórek opisuje poniższe równanie Monoda [110]:

$$\mu = 0,058 \cdot \frac{S}{0,101 + S} \quad (13)$$

Obserwowany spadek poziomu przyrostu biomasy w medium zawierającym jony Cr(III) opisuje równanie eksperymentalne [110]:

$$\mu_{Cr^{3+}} = \mu \cdot \left(1 - \frac{c_{Me}}{6,33 + c_{Me}} \right) \quad (14)$$

gdzie $\mu_{Cr^{3+}}$ jest współczynnikiem wzrostu komórek *Spirulina sp.* w medium zawierającym jony chromianowe Cr(III). Uwzględniając dwie powyższe zależności otrzymujemy:

$$\mu_{Cr^{3+}} = 0,058 \cdot \left(\frac{S}{0,101 + S} \right) \cdot \left(1 - \frac{c_{Me}}{6,33 + c_{Me}} \right) \quad (15)$$

Dlatego, w przypadku obecności jonów chromianowych w medium odżywczym, przyrost biomasy może być określony poniższą zależnością:

$$\frac{dX}{dt} = 0,058 \cdot \left(\frac{S}{0,101 + S} \right) \cdot \left(1 - \frac{c_{Me}}{6,33 + c_{Me}} \right) \cdot X \quad (16)$$

Równanie bilansu masy można w prosty sposób rozwiązać analitycznie zakładając, iż koniec procesu bioakumulacji opisuje stan pseudo-stacjonarny,* w którym stężenia c_{Me} , c_{pas} oraz c_{act} nie podlegają dalszym zmianom. Taki stan pseudo-stacjonarny opisuje równanie:

$$\frac{dc_{Me}}{dt} = \frac{dc_{pas}}{dt} = \frac{dc_{act}}{dt} = 0 \quad (17)$$

Z układu równań dla stanu pseudostacjonarnego, opisującego zależności pod koniec procesu otrzymano dwie zależności:

$$k_{-pas} = 0,8125 \cdot k_{pas} \quad (18)$$

$$k_{-act} = 0,02107 \cdot k_{act} \quad (19)$$

Uwzględniając wcześniejsze równania otrzymuje się dwie zależności:

$$\frac{dc_{pas}}{dt} = k_{pas} \cdot X(t) \cdot c_{Me}(t) - 0,8125 \cdot k_{pas} \cdot X(t) \cdot c_{pas}(t) - k_{act} \cdot X(t) \cdot c_{pas}(t) + 0,02107 \cdot k_{act} \cdot X(t) \cdot c_{act} \quad (20)$$

$$\frac{dc_{akt}}{dt} = k_{act} \cdot X(t) \cdot c_{pas}(t) - 0,02107 \cdot k_{act} \cdot X(t) \cdot c_{act} \quad (21)$$

Powyższy układ równań rozwiązano przy użyciu programu *Mathematica* wykorzystując zaimplementowaną w programie metodę regresji nieliniowej, uzyskując następujące wartości parametrów: $k_{pas} = 5,88$ [dm³/(g·h)]; $k_{-pas} = 1,39$ [dm³/(g·h)];

$k_{act} = 0,11$ [dm³/(g·h)] oraz $k_{-act} = 0,005$ [dm³/(g·h)]. Końcowa zależność okazała się bardzo rozbudowana [94], jednakże dość dokładnie odzwierciedlała przebieg eksperymentu, a wyznaczony metodą najmniejszych kwadratów błąd dopasowania wynosił 14%.

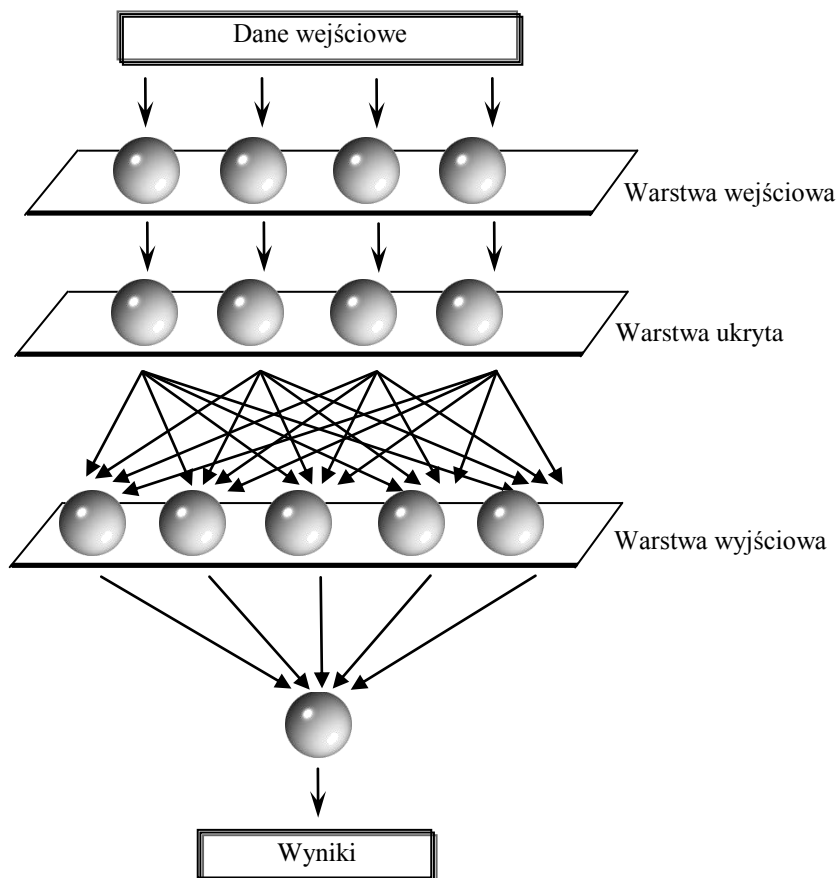
2.12.2 Model sztucznej sieci neuronowej

Równoległe z modelem opisującym kinetykę procesu bioakumulacji w oparciu o układ równań kinetycznych wykorzystano zgromadzone dane eksperymentalne, do zbudowania sztucznej sieci neuronowej. W przeciwieństwie do modelu kinetycznego, algorytm sztucznej sieci neuronowej, nie wymaga wprowadzenia *a priori* równań kinetycznych, ani określania wzajemnych zależności określających zmianę stężenia jonów metalu w poszczególnych etapach reakcji. Dlatego metody wykorzystujące sztuczną sieć neuronową są wykorzystywane m. in. przy modelowaniu nie-liniowych procesów, których opisanie poprzez układ odpowiednich równań matematycznych jest trudne [54].

Spośród ponad 50 różnych architektur sieci neuronowych [118] wykorzystano zaimplementowany w programie MATLAB[®] firmy MathWorks algorytm Levenberga-Marquardta z pięcioma neuronami w warstwie ukrytej (Fig. 3).

Jako wektor wejściowy (*training vector*) wykorzystano dane eksperymentalne uzyskane dla stężenia jonów chromianowych w pożywce równego 25,6 mg/kg, natomiast jako wektor sprawdzający (*testing vector*) wykorzystano dane dla stężenia jonów Cr(III) w pożywce równego 19,2 mg/kg. Na podstawie danych testowych określono szacunkową wartość błędu przy opisie procesu bioakumulacji poprzez sieć neuronową na poziomie 4,5%.

* Ze względu na złożoność procesu bioakumulacji jonów chromianowych przez *Spirulinę sp.*, założenie o stanie pseudo-stacjonarnym może nie być właściwe. Z tego powodu przy końcowym wyznaczaniu parametrów modelu, nie została narzucona liniowa zależność pomiędzy parametrami k_{act} i k_{-act} oraz k_{pas} i k_{-pas} [94].



Rys. 2.8. Reprezentacja architektury trzy warstwowej sieci neuronowej z pięcioma neuronami w warstwie ukrytej użyta do modelowanie kinetyki procesu bioakumulacji.

2.13 Omówienie przedstawionych modeli

W pierwszym z przedstawionych modeli bioakumulacji, każdemu parametrowi można przypisać określony sens fizyczny. Stała k_{pas} jest współczynnikiem określającym szybkość absorpcji metalu do powierzchni komórki, k_{-pas} – określa szybkość desorpcji jonów z powierzchni komórki (etap pasywny), k_{act} – opisuje szybkość aktywnego transportu jonów Cr(III) z powierzchni komórki do jej wnętrza, natomiast k_{-act} – określa szybkość uwalniania bioakumulowanych jonów Cr(III) z wnętrza komórki.

Wartość stałej szybkości k_{pas} jest znacząco wyższa od pozostałych stałych. Oznacza to, iż proces absorpcji jonów Cr(III) na powierzchni alg jest najszybszym etapem bioakumulacji. Natomiast wartość stałej k_{-pas} odzwierciedla relatywnie szybki proces elucji jonów chromianowych zaabsorbowanych na powierzchni komórki. Stosunek stałej k_{pas} do k_{act}

sugeruje, że proces aktywnego transportu jest około 50 razy wolniejszy od adsorpcji jonów metalu na powierzchni komórki. Bardzo niska wartość stałej k_{act} świadczy o poprawności wyboru alg *Spirulina* jako biosorbera, gdyż prędkość uwalniania jonów chromianowych które uległy bioakumulacji wewnątrz komórki jest bardzo niska. Stosunek stałych k_{pas} i k_{act} potwierdza przyjęte w pracy uproszczenie oraz świadczy, że praktycznie tylko jony zaabsorbowane na powierzchni komórek są uwalniane w procesie elucji.

Pierwszy z przedstawionych modeli bazuje na analizie mechanizmu reakcji bioakumulacji, natomiast model sieci neuronowych jest strukturą matematyczną realizującą obliczenia poprzez rzędy elementów (sztucznych neuronów) *de facto* z pominięciem opisu mechanizmu reakcji. Atutem pierwszego z przedstawionych modeli jest to, iż na podstawie wyznaczonych wartości parametrów modelu, możemy lepiej opisać poszczególne etapy procesu bioakumulacji. Natomiast w przypadku sieci neuronowych możemy prognozować zmianę stężenia jonów metalu, wykorzystując jedynie dane eksperymentalne do „nauczanie” sieci, w oderwaniu od określenia fizycznych zależności pomiędzy poszczególnymi etapami samego procesu. Dodatkowo algorytm uczenia sieci neuronowych w procesie iteracyjnym związany jest z minimalizacją funkcji błędu. Porównując błędy dopasowania w obu modelach należy wziąć pod uwagę, iż proponowany model kinetyczny miał cztery stopnie swobody, natomiast sieć neuronowa była rozpięta na pięciu neuronach w fazie ukrytej.

Generalnie algorytmem sztucznych sieci neuronowych można interpolować zmianę stężenia metalu w procesie bioakumulacji, natomiast algorytm ten zawodzi w przypadku ekstrapolacji. Model kinetyczny natomiast pozwala analizować różne aspekty procesu bioakumulacji, a uzyskane wyniki można wykorzystać przy modelowaniu rozwiązań przemysłowych wykorzystujących algi *Spirulina sp.* do bioakumulacji jonów Cr(III)*.

* Podobny model można wykorzystać także do prognozowania bioakumulacji innych metali. Dotyczy to także sytuacji, gdy stężenie metalu jest na tyle niskie, iż nie opłaca się go pozyskiwać metodami konwencjonalnymi (np. w przypadku odzysku uranu z wód pokopalnianych) [118].

2. 14 Podsumowanie

W rozdziale przedstawiono trzy wybrane modele przedstawiające różne aspekty związane z modelowaniem komputerowym procesów biochemicznych i biotechnologicznych:

- ✚ Model iteracyjny bazujący na mechanizmie reakcji enzymatycznej, w którym uwzględniono specyficzne powinowactwo enzymu względem substratu.
- ✚ Model fizyczny opisujący kinetykę reakcji, uwzględniający sposób absorpcji metalu oraz późniejsze etapy biosorpcji.
- ✚ Model sieci neuronowych opierający się na wektorach danych, de facto pomijający sam mechanizm reakcji.

Jak pokazano w tekście, dwa pierwsze modele bazujące na mechanizmach reakcji, umożliwiają szersze analizowanie układów i prognozowanie wpływu dodatkowych czynników na przebieg procesu*. Model sieci neuronowych pozwala natomiast pominąć opis fizyczny i (bio)chemiczny procesu, wykorzystując model matematyczny, składającym się z sieci węzłów obliczeniowych zwanych neuronami i ich połączeń.

Warto podkreślić aspekt praktyczny związany z modelowaniem przedstawionych procesów. Modele pozwalają nie tylko prognozować samą ewolucję układu, ale także opracować technologię prowadzenia danego procesu oraz dobrać optymalne warunki do przeprowadzenia danej reakcji i znacząco ułatwiają przejście ze skali laboratoryjnej do skali przemysłowej w przypadku wdrożenia i komercyjnych aplikacji.

Trafność wyboru przedstawionych tematów potwierdza znacząca liczba publikacji, w których autorzy poszukują nowych źródeł pozyskiwania enzymów amylolitycznych [120-122] w przypadku degradacji skrobi, bądź nowych szczepów będących naturalnymi biosorberami [123, 124]. Wzrasta też liczba potencjalnych aplikacji przemysłowych omawianych w pracy procesów [105, 106, 125], jednak jednym z pierwszych kroków do ich wdrożenia jest stworzenie odpowiednich modeli opisujących dany proces.

* Przykładowo pierwszy z prezentowanych modeli oprócz samego śledzenia ewolucji stężeń poszczególnych reagentów w modelowanym układzie, pozwala na uwzględnienie budowy biopolimeru (struktura liniowa, usieciowana 2D lub 3D, rozgałęziona); uwzględnienie zmian substratu podczas reakcji; miejsce ataku enzymu (endo- i egzoenzymy) i jego dezaktywację; inhibicje (substratową, produktami reakcji, kompetycyjną, niekompetycyjną, akompetycyjną); wzajemne interakcje enzymy - substrat (synergizm, konkurencja); reakcje nieenzymatyczne przebiegające równoległe z procesem enzymatycznej degradacji biopolimerów oraz warunki sferyczne ataku enzym - substrat.

2.15 Bibliografia – rozdział II

- [1] A. Higson, C. Smith; *NNFCC Renewable Chemicals Factsheet: Starch*; The National Non-Food Crops Centre, York, UK (2012).
- [2] R.P. Ellis, M. P. Cochrane, M.F.B. Dale, C.M. Duffus, A. Lynn, I.M. Morrison, R.D.M. Prentice, J. S. Swanston, S. A. Tiller; *J Sci Food Agric*, 77 (1998) 289-311.
- [3] Przepisy wydane na podstawie art. 22 ust. 6 ustawy z dnia 25 sierpnia 2006 r. o biokomponentach i biopaliwach ciekłych (Dz.U. Nr 169, poz. 1199, z późn. zm.).
- [4] R. Parker, S. G. Ring; *Journal of Cereal Science* 34 (2001) 1–17.
- [5] J. N. BeMiller, K. C. Huber; *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (2002), DOI: 10.1002/14356007.a25_001.pub4
- [6] J.F. Robyt, R. Mukerjea; *Starch/Stärke* 2012, 00, 1–14.
- [7] National Starch and Chemical Company, Bridgewater Office, 10 FINDERNE AVE, BRIDGEWATER, NJ 08807, <http://www.nationalstarch.com>
- [8] W.D. Crabb, J.K. Shetty; *Current Opinion in Microbiology*; 2 (1999) 252–256.
- [9] A.M. Castro, L.R. Castilho, D.M.G. Freire; *Biomass Conv. Bioref.* 1 (2011) 245–255.
- [10] J. Marín-Navarro, J. Polaina; *Appl Microbiol Biotechnol* 89 (2011) 1267–1273.
- [11] D. Voet, J. G. Voet; *Biochemistry*; John Wiley & Sons, Inc., New York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore (1990).
- [12] J.M. Berg, L. Stryer, J.L. Tymoczko; *Biochemia* (wydanie czwarte, zmienione); Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (2011).
- [13] K.-M. Park, S.-Y. Jun, K.-H. Choi, K.-H. Park, C.-S. Park, J. Cha; *Appl Microbiol Biotechnol* 86 (2010) 555–566.
- [14] M.S. Lu, Y. Fang, H. Li, H. Liu, S. Wang; *Ann Microbiol* 60 (2010) 557–563.
- [15] O. Prakash, N. Jaiswal; *Appl Biochem Biotechnol* 160 (2010) 2401–2414.
- [16] Z. L. Nikolov, M. M. Meagher, P. J. Reilly; *Biotech. Bioeng.* 34 (1989) 694-704.
- [17] L. Michaelis, M. L. Menten; *Biochem. Z.* 49 (1903) 333.
- [18] I. H. Segel; *Enzyme Kinetics - Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*; John Wiley & Sons, Inc., New York-London-Sydney-Toronto (1975).
- [19] P. Kafarski, B. Lejczak; *Chemia bioorganiczna*; Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (1994).
- [20] J. Kączkowski; *Podstawy biochemii*; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa (1993).

- [21] R.M. Costa, F.X. Malcata; *Bioproc. Engn.* 10 (1994) 155-159.
- [22] J. V. Carbonell, L. Izquierdo, J. M. Sendra, P. Manzanares; *Biotechnol. Bioeng.* 60, 105-113 (1998).
- [23] L.M. Marchal, J. Zondervan, J. Bergsma, H.H. Beftink, J. Tramper; *Bioprocess and Biosystems Engineering* 24 (2001) 163-170.
- [24] L.M. Marchal, R. V. Ulijn, C. D. de Gooijer, G. T. Franke, J. Tramper; *Bioprocess Biosyst Eng* 26 (2003) 123–132.
- [25] P. Wojciechowski, A. Kozioł, A. Noworyta; *Biotechnol Bioeng.* 75 (2001) 530–539.
- [26] T. Besselink, T. Baks, A.E.M. Janssen, R.M. Boom; *Biotechnology and Bioengineering* 100 (2008) 684-697.
- [27] V. Komolprasert, R. Y. Ofoli; *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 51 (1991) 209-223.
- [28] A.R. Chavan, A. Raghunathan, K. V. Venkatesh; *J Ind Microbiol Biotechnol* 36 (2009) 509–519.
- [29] H. Nakatani; *Biopolymers* 39 (1996) 665-669.
- [30] A. Noworyta, P. Wojciechowski, J. Bryjak; *Modelowa analiza enzymatycznego procesu upłynniania skrobi*; XV Ogólnopolska Konferencja Naukowa Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Materiały konferencyjne Komitet Inżynierii Chemicznej i Procesowej PAN, tom 4, Właściwości materiałów, procesy membranowe, bioproceny i bioreaktory, zagadnienia ochrony środowiska; 160-165, Gdańsk (1995).
- [31] J.-H. Q. Pinto, S. Kaliaguine; *AIChE J.* 37 (1991) 905-914.
- [32] A. B. Pasari, R. A. Korus, R. C. Heimsch; *Enzyme Microbiol. Technol.* 10 (1988) 156-160.
- [33] E. M. Steverson, R. A. Korus, W. Admassu, R. C. Heimsch; *Enzyme Microbiol Technol.* 6 (1984) 549-554.
- [34] V. Komolprasert, R. Y. Ofoli; *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 51 (1991) 209-223.
- [35] A. Marc, J. M. Engasser, M. Moll, R. Flayeux; *Biotech. Bioeng.* 25 (1983) 481-496.
- [36] P. Reinikainen, T. Suortti, J. Olkku, Y. Malkki, P. Linko; *Starch* 38 (1986) 20-26.
- [37] L. Hakkarainen, P. Linko; *J. Food Eng.* 4 (1985) 135-153.
- [38] J. E. Rollings, R. W. Thompson; *Biotechnol. Bioeng.* 26 (1984) 1475-1484.
- [39] H. Henriksnäs, T. Lövgren; *Biochem. Bioeng.* 20 (1978) 1303-1307.
- [40] D. Yankov, E. Dobрева, V. Beschkov, E. Emanuilova; *Enzyme Microbiol. Technol.* 8 (1986) 665-667.
- [41] W. E. Henderson, W. M. Teague; *Starch* 40 (1988) 412-418.
- [42] A. Tanaka, S. Takeda; *Biosci. Biotech. Biochem.* 59 (1995) 1372-1373.

- [43] K. Kusunoki, K. Kawakami, F. Shiraishi, K. Kato, M. Kai; *Biotechnol. Bioeng.* 24 (1982) 347-354.
- [44] M. Kumakura, I. Kaetsu; *Biotechnol. Bioeng.* 20 (1978) 1309-1315.
- [45] J. T. Park, J. E. Rollings; *Biotechnol. Bioeng.* 44 (1994) 792-800.
- [46] J. T. Park, J. E. Rollings; *Biotechnol. Bioeng.* 46 (1995) 36-42.
- [47] H. Henriksnäs, T. Lövgren; *Biochem. Bioeng.* 20 (1978) 1303-1307.
- [48] A. Marc, J. M. Engasser, M. Moll, R. Flayeux; *Biotech. Bioeng.* 25 (1983) 481-496.
- [49] M. Fujii, Y. Kawamura; *Biotechnol. Bioeng.* 27 (1985) 260-265.
- [50] K. Mårtensson; *Biotechnol. Bioeng.* 16 (1974) 1567-1587.
- [51] K. N. Waliszewski, M. Garcia, A., J. De La Cruz Medina; *International J. of Food and Technology* 27 (1992) 465-472.
- [52] M. Okazaki, M. Moo-Young; *Biotechnol. Bioeng.* 20 (1978) 637-663.
- [53] J. Medve, J. Karlsson, D. Lee, F. Tjerneld; *Biotechnol. Bioeng.* 59 (1998) 621-634.
- [54] J. Bryjak, K. Murlikiewicz, I. Zbiciński, J. Stawczyk; *Bioprocess Eng.* 23 (2000) 351.
- [55] J. Bryjak, K. Ciesielski, I. Zbiciński; *J. Biotechnol.* 114 (2004) 177.
- [56] K. Ciesielski, J. Bryjak, I. Zbiciński; *Inż. Chem. Proc.* 25 (2004) 801.
- [57] J. Bryjak; *Biotechnologia* 44 (1999) 180-200.
- [58] J. Bryjak; *Biotechnologia* 44 (1999) 201-225.
- [59] K. Ciesielski, J. Bryjak, I. Zbiciński; *Inż. Chem. Proc.* 22 (2001) 355.
- [60] J. Bryjak; *Inż. Chem. Proc.* 22 (2001) 295.
- [61] J. Bryjak; *Inż. Chem. Proc.* 22 (2001) 345.
- [62] M. Polakovic, J. Bryjak; *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 19 (2002) 443.
- [63] J. Bryjak; *Biochem. Eng. J.* 16 (2003) 347.
- [64] J. Bryjak, L. Królikowski; *Inż. Chem. Proc.* 25 (2004) 745.
- [65] M. Polakovic, J. Bryjak; *Biochem. Eng. J.* 18 (2004) 57.
- [66] A. Hamerska-Dudra, J. Bryjak, A. Trochimeczuk; *Enzyme Microb. Technol.* 41 (2007) 197.
- [67] K. Hiromi, M. Ohnishi, A. Tanaka; *Molecular and Cellular Biochemistry* 51 (1983) 79-95.
- [68] K. Hiromi, Y. Nitta, C. Kumata, S. Ono; *Biochim. Biophys. Acta* 302 (1973) 362-375.
- [69] M. Kato, K. Hiromi, Y. Morita; *J. Biochem.* 75 (1974) 563-576.
- [70] T. Suganuma, R. Matsuno, M. Ohnishi, K. Hiromi; *J. Biochem.* 84 (1978) 293-316.

- [71] S. Iwasa, H. Aoshima, K. Hiromi, H. Hatano; *J. Biochem.* 75 (1974) 969-978.
- [72] J. A. Thoma, C. Brothers, J. Spradlin; *Biochemistry* 9 (1970) 1768-1775.
- [73] K. Hiromi, *Developments in Food Science*, Elsevier Scientific Publishing Company, Tokyo-Amsterdam-Oxford-New York, 2 (1979).
- [74] Н. В. Газова, Г. А. Тищенко, Т. Д. Муравьева, Т. С. Потезина, Г. З. Елькин, Г. В. Самсонов, *Прикладная Бионимия И Микробиология* 23 (1987) 542.
- [75] P. Wojciechowski, I. Grad; *Fuzzy logic model of starch hydrolysis by different types of enzymes attack mechanism*; Materiały konferencyjne: XI Ogólnopolska Szkoła Chemii, Szklarska Poręba, 8-12 listopad (1999).
- [76] P. Wojciechowski, W. Zierkiewicz; *Symulacja procesów enzymatycznej degradacji polimerów z uwzględnieniem reakcji multienzymatycznych i multisubstratowych*; 1 Krajowa Konferencja Naukowa SIC'2001, Iwonicz-Zdrój, 25-27 October (2001).
- [77] P. Wojciechowski; *Wiadomości Chemiczne* 55, 5-6 (2001) 474-490.
- [78] P. Wojciechowski, W. Zierkiewicz; *Symulacja procesów enzymatycznej degradacji polimerów z uwzględnieniem reakcji multienzymatycznych i multisubstratowych*; Zeszyty Naukowe Politechniki Rzeszowskiej, Systemy Informacyjne w Chemii, 1 (Rzeszów 2002) 117-120.
- [79] P. Wojciechowski, E. Zienkiewicz, A. Kozioł, A. Noworyta; *Analiza modelowa kinetyki reakcji enzymatycznej hydrolizy skrobi przy udziale endo- i egzo-enzymów amyloolitycznych*; Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej, 822 (1999) 167-172.
- [80] P. Wojciechowski, E. Zienkiewicz, A. Kozioł, A. Noworyta; *Analiza modelowa kinetyki reakcji enzymatycznej hydrolizy skrobi przy udziale endo- i egzo-enzymów amyloolitycznych*; Materiały konferencyjne: I Krajowy Kongres Biotechnologii, Wrocław 20-25 wrzesień (1999).
- [81] P.C. Ashly, M.J. Joseph, P.V. Mohanan, *Food Chemistry* 127 (2011) 1808–1813.
- [82] G. F. Bickerstaff, *Immobilization of enzymes and cells*. Totowa, N.J.: Humana Press (1997).
- [83] K. Labus, I. Gancarz, J. Bryjak; *Mat. Sci. Eng. C* 32 (2012) 228.
-
- [84] A. Malik, *Environment International* 30 (2004) 261–278.
- [85] Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 28 stycznia 2009 roku w sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu ścieków do wód lub ziemi, oraz w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego (Dz. U. Nr 27, poz. 169).
- [86] F. Veglio, F. Beolchini; *Hydrometallurgy* 44 (1997) 301–316.
- [87] P. Pavasant, R. Apiratikul, V. Sungkhum, P. Suthiparinyanont, S. Wattanachira, T.F. Marhaba, *Bioresource Technology* 97 (2006) 2321–2329.

- [88] W. Oswald, H.B. Gootas; *Trans Am Soc Civ Eng* 122 (1957) 73-105.
- [89] W. J. Oswald, *Micro-algae and waste-water treatment*. w: Borowitzka MA, Borowitzka LJ. editors. *Micro-Algal Biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press. (1988) p 305-328.
- [90] M. Urbańska, G. Kłosowski; *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych* 51 (2012) 62-77.
- [91] E. Klimiuk, M. Łebkowska, *Biotechnologia w ochronie środowiska*. PWN, Warszawa 2005.
- [92] K. Chojnacka; *Enviroment International* 36 (2010) 299-307.
- [93] K. Chojnacka, A. Chojnacki, H. Górecka; *Hydrometallurgy* 73 (2004) 147-153.
- [94] K. Chojnacka, P. Wojciechowski; *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 2, 4 (2007) 291-298.
- [95] X. Wang, R.C.H Dei; *Environ Pollut* 111 (2001) 233-240.
- [96] K. Gin, Y.Z. Tang, M.A. Aziz, *Heavy Metal Uptake by Algae*. w: H. Kojima, Y.K.Lee editors. *Photosynthetic Microorganisms in Environmental Biotechnology*. Berlin: Springer (2001) 137-169.
- [97] K. Chojnacka, A. Noworyta, *Prace Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej*, Vol. 26, z. 2 (2000) 101-110.
- [98] National Research Council. *Recommended dietary allowances*. Washington: National Academy of Science 1989.
- [99] R. van Cauwenberg, P. Hendrix, H. Robberecht, H.A. Deelstra; *European Food Research and Technology / Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 203 (1996) 203-206.
- [100] R.A. Anderson: *Stress effects on chromium nutrition of humans and farm animals*. w Anonymous (ed): "Proc Alltech's Tenth Symposium Biotechnology in the Feed Industry." Nottingham, England: Univ Press (1994) 267-274.
- [101] R.A. Anderson, N. Cheng, N.A. Bryden, M.M. Polansky, J. Chi, J. Feng; *Diabetes* 46 (1997) 1786-1791.
- [102] O. Ei-Ichiro, *Bioinorganic Chemistry: A Survey* (2nd Edition), St. Louis, MO, USA: Academic Press, 2008.
- [103] A. Zielińska, K. Chojnacka; *Przem. Chem.* 88 (2009) 594-596.
- [104] A. Zielińska, I. Michalak, K. Chojnacka; *Chemik* 11 (2007) 534-543.
- [105] K. Chojnacka; *Przem. Chem.* 88 (2009) 414-418.
- [106] K. Chojnacka, H. Górecki, H. Górecka, J. Hoffmann, Z. Dobrzański, A. Bartkowiak, M. Barańska; *Sposób wytwarzania mineralnych dodatków paszowych na bazie mikroalg*. Zgłoszenie patentowe, PL-374 454, BUP 30-10-2006 22./2006.

- [107] I. Michalak, K. Chojnacka; *Przem. Chem.* 89 (2010) 486–489.
- [108] K. Chojnacka, A. Noworyta; *Enzyme Microb Technol.* 34 (2004) 461-465.
- [109] C. Zarrouk, *Contribution l'étude d'une cyanophyce e Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthe`se de Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler PhD Thesis. University of Paris. Paris, France 1966.
- [110] K. Chojnacka, K. *Heavy metal ions removal by microalgae Spirulina sp. in the processes of biosorption and bioaccumulation.* PhD Dissertation. Wroclaw University of Technology 2003.
- [111] J. Kiusalaas, *Numerical Methods of Engineering with MATLAB*, Cambridge University Press (2005); eISBN: 9780511199561.
- [112] K. Chojnacka; *Journal of Hazardous Materials B121* (2005) 167-173.
- [113] K. Chojnacka; *Chemosphere* 59 (2004) 315-320.
- [114] Z.-Y. Li, S.-Y. Guo, L. L.; *Journal of Food Engineering*, 75 (2006) 129-136.
- [115] K. Chojnacka, A. Chojnacki, H. Górecka; *Chemosphere* 59 (2005) 75-84.
- [116] E. Finocchio, A. Lodi, C. Solisio, A. Converti; *Chemical Engineering Journal* 156 (2010) 264–269.
- [117] A. Lodi, D. Soletto, C. Solisio, A. Converti; *Chemical Engineering Journal* 136 (2008) 151–155.
- [118] F. Rosenblatt; *Principles of Neurodynamics*. Washington D.C.: Spartan Press. 1961.
- [119] A. Dheetcha, S. Mishra; *Curr Microbiol* 57 (2008) 508–514.
- [120] U. Uthumporn, A.A. Karim, A. Fazilah; *Industrial Crops and Products* 43 (2013) 441-449.
- [121] D. Mehta, T., Satyanarayana; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 85-86 (2013) 229-238.
- [122] P. Tomasik, D Horton; *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 68 (2012) 59-436.
- [123] S.R. Subashchandrabose, B. Ramakrishnan, M. Megharaj, K. Venkateswarlu, R. Naidu; *Environment International* 51 (2013) 59-72.
- [124] E.J. Olguín, G. Sánchez-Galván; *New Biotechnology* 30 (1) (2012) 3-8.
- [125] G. Tarawali, C. Iyangbe, U.E. Udensi, P. Ilona, T. Osun, C. Okater, G.N. Asumugha, G.N; *Journal of Food, Agriculture and Environment* 10 (2012) 689-694.

2. 16 Lista parametrów modeli opisanych w rozdziale

SYMBOL:	OPIS:
$x \xleftarrow{y}$	Podjednostka glukozy o numerze y , "grot strzały" wskazuje węgiel C_1 w podjednostce glukozy, x jest binarną wartością charakterystyczną określoną w pracy dla podjednostki glukozy y
A	Funkcja charakterystyczna, $A \in (0,1)$
B	Funkcja połączeń, $B \in (N + 0)$
c_E	Stężenie enzymu [mol/dm^3]
c_{gl}	Stężenie glukozy mogącej powstać w wyniku całkowitej hydrolizy polocukru do wolnej glikozy [mol/dm^3]
c_P	Stężenie produktu [mol/dm^3]
c_S	Stężenie substratu [mol/dm^3]
c_{S+P}	Sumaryczne stężenie substratu i produktu [mol/dm^3]
$c_{x,0}$	Stężenie substancji x na początku reakcji [mol/dm^3]
$c_{x,k}$	Stężenie substancji x na końcu reakcji [mol/dm^3]
lg	Liczba podjednostek glukozy w cząsteczce
lg_{am}	Liczba podjednostek glukozy w cząsteczce amylozy
lg_{ap}	Liczba podjednostek glukozy w cząsteczce amylopektyny
lg_{calk}	Całkowita liczba podjednostek glukozy w rozpatrywanym układzie
n	Numer podjednostki glukozy
n	Numer iteracji
n_k	Numer iteracji dla końca symulacji
p	Zmienna określana każdorazowo w sposób losowy, będąca liczbą rzeczywista z przedziału domkniętego od 0 do 1.
p_{iak}	Prawdopodobieństwo zajścia inhibicji akompetycyjnej; $p_{iak} \in [0, 1]$
p_{ink}	Prawdopodobieństwo zajścia inhibicji niekompetycyjnej; $p_{ink} \in [0, 1]$
t	Czas reakcji [s]
t_{ak}	Średni czas zderzenia aktywnego [s]
t_{iak}	Średni czas zderzenia aktywnego z inhibicją akompetycyjną [s]
t_{ink}	Średni czas trwania kompleksu inhibitor kompetycyjny-substrat [s]
t_{ink}	Średni czas zderzenia aktywnego z inhibicją niekompetycyjną [s]
t_{nak}	Średni czas zderzenia nieaktywnego [s]
t_R	Czas reakcji [s]
V_{max}	Maksymalna szybkość reakcji [$\text{mol}/\text{dm}^3 \cdot \text{s}$]
V_R	Szybkość reakcji [$\text{mol}/\text{dm}^3 \cdot \text{s}$]
wa_{am}	Ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylozy, które potencjalnie są podatne na atak α -amylazy
wa_{ap}	Ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylopektyny, które potencjalnie są podatne na atak α -amylazy
w_{am}	Liczba wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylozy

w_{ap}	Liczba wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylopektyny
wb_{am}	Ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylozy potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy
wb_{ap}	Ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylopektyny potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy
weg_{ap}	Ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylopektyny potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania <i>egzo</i> - α -D-glukanazy
wgl_{am}	Ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylozy potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania glikoamylazy
wgl_{ap}	Ilość wiązań α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylopektyny potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania glikoamylazy
wh_{am}	Numer wiązania α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylozy, licząc od końca redukującego, hydrolizowanego w wyniku ataku enzymu amyloolitycznego
wh_{ap}	Numer wiązania α -1 \rightarrow 4 w cząsteczce amylopektyny, licząc od końca redukującego, hydrolizowanego w wyniku ataku enzymu amyloolitycznego
wp_{ap}	Ilość wiązań α -1 \rightarrow 6 w cząsteczce amylopektyny potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania pullulanazy

μ	Szybkość wzrostu [h^{-1}]
a	Bezwymiarowy współczynnik adsorpcji []
b	Parametr Langmuira [kg/mg]
c_{accum}	Stężenie jonów Cr(III) wewnątrz komórek [mg/kg]
c_{Me}	Stężenie jonów Cr(III) w roztworze [mg/kg]
c_{pas}	Stężenie jonów Cr(III) zaabsorbowanych na powierzchni biomasy [mg/kg]
c_{tran}	Stężenie jonów Cr(III) związanych z białkami transportowymi [mg/kg]
k_a	Stała szybkości akumulacji wewnątrz komórek [$dm^3/(g \cdot h)$]
k_{act}	Stała szybkości aktywnego transportu przez błonę komórkową i bioakumulacji wewnątrz komórek [$dm^3/(g \cdot h)$]
k_{pas}	Stała szybkości sorpcji jonów Cr(III) na powierzchni komórek (<i>passive process</i>) [$dm^3/(g \cdot h)$]
K_S	Stała nasycenia [g/dm^3]
k_t	Stała szybkości aktywnego transportu przez membranę komórkową [$dm^3/(g \cdot h)$]
S	Stężenie glukozy w medium odżywczym [g/dm^3]
t	Czas [h]
X	Stężenie biomasy [g/dm^3]

3 E-learning

3.1 E-chemia - wprowadzenie

Termin ‘e-chemia’ ma dużą pojemność semantyczną i definiuje się szeroki zbiór zagadnień określanych potocznie jako „*elektroniczna chemia*” związanych z zastosowaniem komputerów oraz sieci komputerowej w chemii [1]. Etymologia słowa ‘e-chemia’ wskazuje na dodanie litery ‘e’ do słowa chemia dla podkreślenia wkładu rozwiązań elektronicznych w rozwój chemii^{*,†}. W poprzednich rozdziałach przedstawiono przykłady zastosowania komputerowych technik obliczeniowych wykorzystanych do prognozowania właściwości cząsteczek (pochodnych aniliny) oraz modelowania przebiegu procesów chemicznych. Jednak szeroko rozumiany rozwój komputeryzacji znacząco wpłynął nie tylko na ekspansję chemii obliczeniowej, lecz także odcisnął swoje piętno w wielu innych aspektach chemii. Pierwszym etapem badań jest na ogół zgromadzenie odpowiedniej informacji naukowej. W tym przypadku znakomicie sprawdzają się specjalistyczne bazy danych, umożliwiające nie tylko wyszukiwanie informacji naukowej po słowach kluczowych, lecz także poprzez wprowadzenie struktury lub fragmentu struktury poszukiwanego związku. Co więcej, bazy faktograficzno–bibliograficzne jak Reaxyx [4][‡], będące powiązaniem intuicyjnej wyszukiwarki reakcji chemicznych, bazy publikacji, bazy związków chemicznych (zawierającej charakterystyki związków wraz z odnośnikami oraz unikalne numery związków CAS) oraz bazy patentów, pozwalające nie tylko na wyszukiwanie związków, lecz także znacząco ułatwiają projektowanie reakcji chemicznej. Przykładowo użytkownik może wprowadzić do aplikacji struktury substratu oraz produktu, a program przeszuka dostępne publikacje, sprawdzając czy dana reakcja nie została wcześniej opisana. Jeśli reakcja przebiega w kilku etapach „wyszukiwarka” może wskazać odnośniki literaturowe, w których zostały opisane poszczególne przejścia i warunki prowadzenia reakcji. Natomiast jeśli syntezowany jest unikalny związek chemiczny, jeszcze nie opisany w literaturze, „inteligentny” program powinien nam wskazać odnośniki dla reakcji jak najbardziej

* Podobną analogię można dostrzec w słowie e-nauczanie (ang. *e-learning*), oznaczającym wsparcie procesu nauczania przez media elektroniczne i sieć Internet.

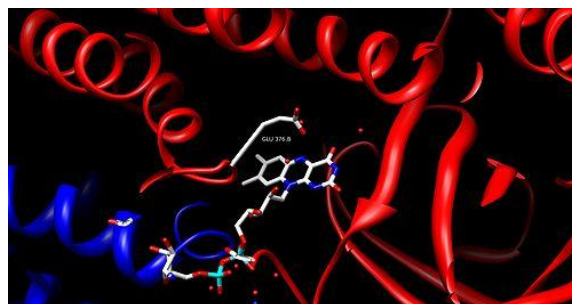
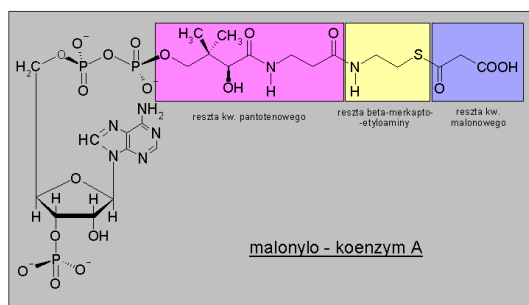
† O popularności terminu ‘e-chemia’ świadczy wzrastająca ilość kursów i portali chemicznych o tej samej semantyce (przykładowo kurs E-chemia udostępniony w ramach projektu Open AGH [2] oraz portal www.e-chemia.pl Politechniki Rzeszowskiej [3]).

‡ Baza Reaxys, zawiera komplet danych z baz CrossFire Belstein, CrossFire Gmelin oraz Patent Chemistry Database.

„podobnych” związków chemicznych. Można pokusić się wręcz o stwierdzenie, iż obecnie chemik wykorzystuje „komputery” prawie we wszystkich etapach swojej pracy, począwszy od poszukiwań literaturowych, poprzez projektowanie reakcji chemicznych, wykorzystywanie specjalistycznego oprogramowania do pomiarów i analizy danych, skończywszy na projektowaniu instalacji chemicznych, wdrażaniu rozwiązań komercyjnych lub przygotowaniu publikacji [1]. Swoiste piętno rozwiązań elektronicznych można dotrzeć między innymi na stronie Biblioteki Głównej i Ośrodka Informacji Naukowo-Technicznej Politechniki Wrocławskiej, gdzie odnośniki do materiałów bibliograficznych zostały oznaczone jako „e-Czasopisma” oraz „e-Źródła A-Z”.

Termin ‘e-chemia’ wiąże się także z procesem dydaktycznym, nauczania uczniów i studentów chemii z wykorzystaniem nowych technologii informatycznych [5]. Przykładowo studenci Wydziału Chemicznego na Politechnice Wrocławskiej zapoznają się z metodami obliczeniowymi oraz technikami modelowania molekularnego cząsteczek (rys. 3.1). Warunkiem zaliczenia laboratorium komputerowego z bioinformatyki jest wykonanie indywidualnego projektu związanego z obliczeniami kwantowymi. Indywidualny projekt z chemii organicznej wymaga od studenta zaprojektowania syntezy związku chemicznego w oparciu o komputerową bazę związków chemicznych i publikacji. Studenci biochemii, korzystają natomiast z komputerowej bazy danych do wyszukiwania sekwencji i struktur biologicznych oraz analizy filogenetycznej. Osobną grupę stanowią zajęcia z inżynierii chemicznej związane z projektowaniem instalacji chemicznych w różnych skalach. Co ciekawe, część projektów chemicznych studenci wykonują zdalnie. Studenci wykonujący projekt z chemii kwantowej, przesyłają zadania poprzez sieć Internet do Wrocławskiego Centrum Sieciowo-Superkomputerowego, gdzie wykonywane są obliczenia. Rozwiązanie takie eliminuje problem licencji, gdyż program wykonujący obliczenia zainstalowany jest na zdalnym komputerze (*klastrze*), a dodatkowym atutem dla studentów dysponujących gorszym sprzętem komputerowym jest możliwość wykonywania skomplikowanych i czasochłonnych projektów obliczeniowych. Usługi kampusowe umożliwiają także zdalną pracę z aplikacjami interakcyjnymi (graficznymi) w środowisku MS Windows, jak np. Sybyl, Matlab lub Simulink. W ten sposób aplikacje mogą być zainstalowane na serwerze zdalnym, a dostęp użytkownika do systemu odbywa się w sposób jednolity poprzez protokół RDP [6]. Obecnie rozwijany jest także ogólnopolski projekt PL-GRID [7], dzięki któremu zarejestrowani użytkownicy poprzez stronę WWW mogą wykonać obliczenia w jednym z polskich centrów superkomputerowych i wykorzystywać takie programy chemiczne jak ADF, Autodock, molpro, Turbomole,

Biomem, MOPAC, GAMESS, NWChem, czy wspomniany pakiet Gaussian. Rozwiązanie to pozwala użytkownikom korzystać z infrastruktury ośrodków obliczeniowych oraz wykonywać zdalnie obliczenia, nawet jeśli nie są one licencjonowane w ich macierzystych ośrodkach naukowych.

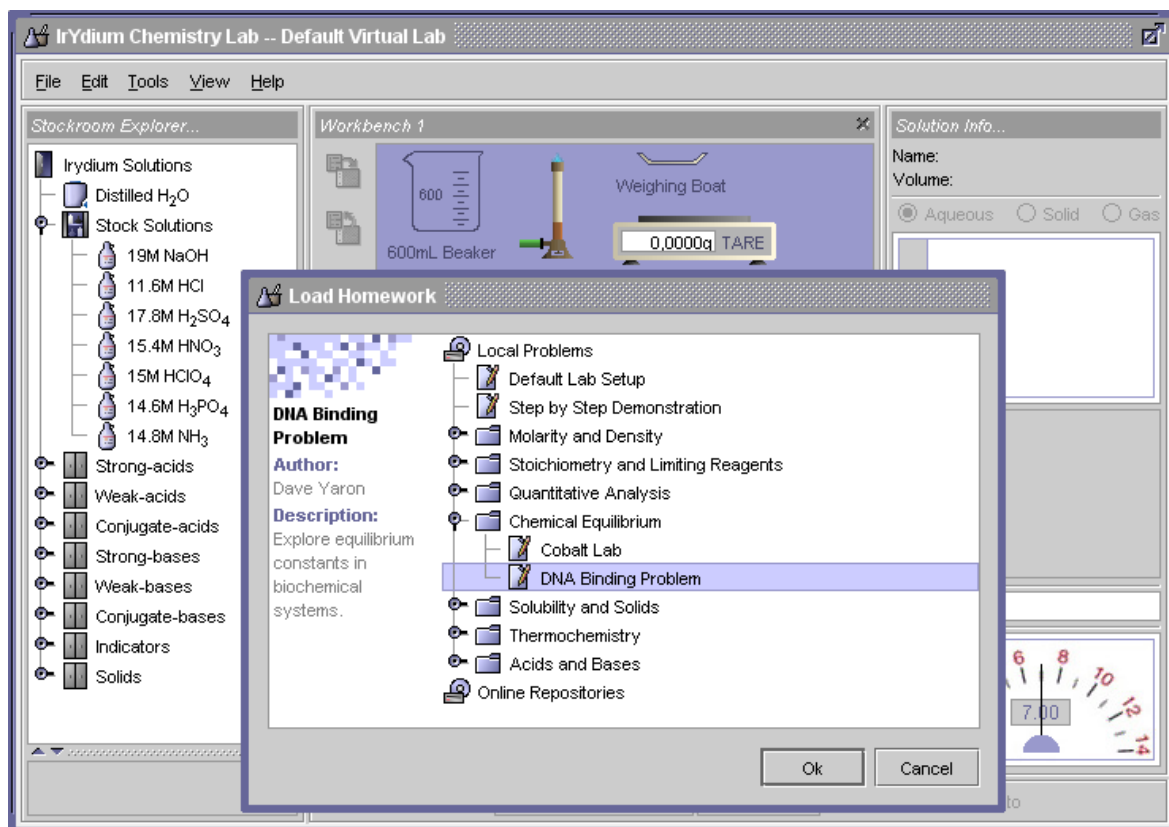


Rys. 3.1. Przykład zadania „powiązanego” z imieniem i nazwiskiem studenta: **malonylo-koenzym **A**, projekt pani **Małgorzaty **Arloty **Kluby****.****

Z punktu widzenia uczelni, ważnym tematem związanym z ‘e-chemią’ jest kwestia nowych podręczników. Zgodni z planami Ministerstwa Edukacji Narodowej każdy papierowy podręcznik, będzie musiał mieć swój elektroniczny odpowiednik. Jednak e-podręcznik nie powinien być tylko samą książką umieszczoną w sieci Internet. Konstrukcja plików hipertekstowych umożliwia powiązanie głównej treści podręcznika ze słownikiem chemicznym, odsyłaczami do układu okresowego, a także do szczegółowego opisu omawianych zagadnień dla bardziej dociekliwych czytelników. Tradycyjne książkowe podręczniki często zawierają opisy reakcji chemicznych lub procesów, których demonstracja z przyczyn obiektywnych może być trudna lub nawet niemożliwa podczas zajęć, natomiast w przypadku e-podręcznika znakomitym uzupełnieniem takiego opisu może być załączony odpowiedni film lub animacja komputerowa. E-podręcznik umożliwia także interaktywną pracę ucznia z załączonym materiałem, a nawet dostęp do wirtualnego laboratorium chemicznego. Najprostsze dostępne na rynku programy pozwalają uczniowi sprawdzić np. w jakich warunkach po zmieszaniu dwóch substancji utworzy się osad i jakiego będzie on koloru. Natomiast bardziej zaawansowane programy, jak przedstawione na rysunku 3.2 wirtualne laboratorium [8, 9], umożliwiają odtworzenie szeregu procesów chemicznych na ekranie komputera, a także interaktywne rozwiązywanie problemów chemicznych*. E-podręcznik umożliwiają pojedynczemu

* Przykładowo, aby przeprowadzić zadaną reakcję w zadaniu, użytkownik na ekranie komputera musi zbudować model odpowiedniej aparatury chemicznej oraz wybrać odpowiednie substraty z bazy reagentów dostępnej w programie.

czytelnikowi tworzenie własnych notatek oraz tworzenie autorskich wersji podręcznika przez grupę uczniów lub studentów. Uczniowie mogą rozwijać e-podręcznik dołączając np. zdjęcia samodzielnie przeprowadzanych eksperymentów, co może być dla nich bodźcem do starannego wykonania i przedstawienia doświadczeń opisanych w e-podręczniku. Modulatorem zawartości e-podręcznika może być wreszcie sam nauczyciel aktualizujący zawartość podręcznika i udostępniający poszczególne partie materiału zgodnie z przebiegiem zajęć lub akceptujący wpisy dodawane przez uczniów.



Rys. 3.2. Zbiór zadań zawartych w wirtualnym laboratorium chemicznym [3].

Obecnie wyzwaniem jest przygotowanie podręcznika interdyscyplinarnego, który mógłby sam „zauważyć”, jakie są omawiane tematy z innych przedmiotów, jak fizyka, czy biologia i na tej podstawie wybrać problemy, które będą w sposób przekrojowy sprawdzały wiedzę ucznia. Przyszłością może być także zunifikowany i „inteligentny” e-podręcznik, który śledząc postępy ucznia, będzie mógł określać, które partie materiału należy ewentualnie powtórzyć, lub zgodnie z zainteresowaniami ucznia, będzie mógł go odesłać do dodatkowych materiałów rozwijających jego wiedzę.

Alternatywą dla przedstawionej koncepcji „uniwersalnego podręcznika” są portale chemiczne, takie jak np. Portal Chemiczny Politechniki Rzeszowskiej [3], Portal Wspierania Dydaktyki Politechniki Wrocławskiej [10], czy otwarte zasoby edukacyjne

Open AGH [2]. Szeroki spektrum prezentowanych na e-portalach kursów odzwierciedla różne koncepcje elektronicznego wspomaganie dydaktyki. Począwszy od zamieszczania na portalu „statycznych” instrukcji i list zadań dla studentów, poprzez wykłady prelegentów udostępnione on-line, animacje* i interaktywne prezentacje, skończywszy na e-lekcjach i elektronicznych sprawdzianach służących do weryfikacji wiedzy studentów. Konstrukcja e-kursów umożliwia udostępnienie poprzez e-portal specjalistycznych narzędzi, pozwalających np. na symulację widm EPR lub NMR. Portale edukacyjne coraz częściej, oprócz samego udostępniania materiałów dydaktycznych, dają użytkownikom szereg dodatkowych aktywności jak quizy sprawdzające poziom wiedzy, lub specjalne fora internetowe, gdzie użytkownicy mogą wymieniać się informacjami związanymi z danym przedmiotem [11-16].

Kategorie kursów	liczba
Elektroniczne Wspomaganie Dydaktyki	3
eKolokwia	1
Kolokwia z Biochemii	1
Kolokwia z Chemii Ogólnej	1
Kolokwia z Fizyki	2
Kolokwia z Podstaw Chemii Fizycznej	3
Kolokwia z Biotechnologii	1
Biochemia - Wydziałowy Zakład Biochemii	5
Biotechnologia	1
Biotechnologia	9
Chemia Analityczna	2
Chemia Fizyczna	1
Pracownia Chemii Fizycznej	1
Wykład Prof. Wojciecha Bartłowiaka	1
Wykład Prof. Ludwika Komorowskiego	5
Wykład Prof. Szczepana Roszaka	1
Wykład Prof. Józefa Lipińskiego	3
Wykład dr hab. Krzysztofa Strasburgera	2
Chemia Nieorganiczna	9
Chemia Teoretyczna	6
Chemia Ogólna	3
Chemia Organiczna	1
Erasmus Mundus	9
Fizyka	4
Informatyka	11
Inżynieria chemiczna i procesowa	18
Pracownia Analizy Instrumentalnej	6
Pozostałe Kursy Wydziałowe	2
Studia niestacjonarne	10
Spektroskopia	3
Technologia Chemiczna	8
Biochemia - Zakład Chemii Medycznej i Mikrobiologii	2
Inżynieria Materiałowa	2

Rys. 3.3. Portale chemiczne Politechniki Rzeszowskiej oraz Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej.

Spośród całego wachlarza zagadnień związanych z e-chemią i procesem dydaktycznym, w niniejszym rozdziale skupiono się na zagadnieniu kontroli kompetencji studentów chemii na przykładzie e-kolokwiów. Temat ten wybrano, gdyż z jednej strony budzi on wiele emocji, a z drugiej strony przedstawia on nowatorskie w skali kraju rozwiązania dydaktyczne wdrożone na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Dodatkowo przedstawiono założenia „elektronicznego korepetytora” jako przykład kursu wyrównawczego z chemii z wykorzystaniem technologii informacyjno-komunikacyjnych.

* Ciekawym narzędziem udostępnionym na portalu Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej jest moduł jmol, umożliwiający interaktywną wizualizację cząsteczek w trybie 3D.

3.2 Elektroniczny korepetytor

Śmiało można postawić tezę, że e-nauczanie jest wymogiem naszych czasów, a sieć Internet najszybszym źródłem informacji. Ideą nowych sposobów nauczania jest umożliwienie szybkiego, trwałego i dostosowanego do odbiorcy sposobu przyswajania wiedzy oraz ułatwienie dostępu do materiałów edukacyjnych przy jednoczesnym uatrakcyjnieniu kursów [17]. Takie perspektywy dają kursy wspomagane i prowadzone w technice e-learningu, umożliwiające wykładowcy opracowanie materiału, który w łatwy sposób dociera do studenta i umożliwia dostosowanie tempa prowadzonych zajęć do indywidualnych potrzeb odbiorcy [16]. Niepodważalnym atutem e-learningu jest praktyczne zniesienie ograniczeń związanych z miejscem i czasem studiowania, co umożliwia pracę zarówno w domu jak i na uczelni, a także stwarza możliwość zdalnego uczestniczenia w kursach podczas popularnych programów wymiany zagranicznej.

Innowacyjnym rozwiązaniem wprowadzonym na Wydziale Chemicznym są e-korepetycje, zawierające omówienie podstawowych zagadnień chemicznych w formie połączonych stron oraz analizę podstawowych typów zadań chemicznych i wraz z omówieniem „krok po kroku” sposobu ich rozwiązywania. Na uwagę zasługuje także nowatorska na Politechnice Wrocławskiej metoda nauczania poprzez sieć Internet, w której student aktywnie uczestniczy w rozwiązywaniu zadania poprzez interaktywne wprowadzanie rozwiązań poszczególnych etapów. Przykładowo rozwiązując zadanie, którego treść przedstawiono na rys. 3.4.1, student w pierwszy etapie musi dobrać współczynniki reakcji (rys.3.4.2). Warto podkreślić, że możliwe jest nie tylko rozróżnianie odpowiedzi „dobrych” i „złych”, ale także odpowiedzi „w części poprawnych”, co przedstawia rysunek 3.4.3, gdzie współczynniki w jednej reakcji oksydacyjno-redukcyjnej zostały podane błędnie, a w dwóch pozostałych poprawnie. Po wprowadzeniu poprawnej odpowiedzi uczestnik przechodzi do kolejnych etapów zadania. W analogiczny sposób wprowadzone zostały do kursów zadania numeryczne (obliczeniowe). Dzięki e-korepetycją student ma do dyspozycji kompendium wiedzy na dany temat, może przeanalizować przykłady rozwiązanych zadań, a następnie może sam ocenić swój poziom zrozumienia tematu przystępując do rozwiązania określonych problemów. W formie e-konsultacji zostały przygotowane kursy z Chemii Ogólnej oraz Chemii Analitycznej [14, 18, 19]. Równolegle opracowano zadania obliczeniowe, w których poszczególne parametry wybierane są w sposób losowy, co daje możliwość generowania pytań, w których wielkości liczbowe nie będą się powtarzać i co dodatkowo

podnosi atrakcyjność kursów. Każdy temat poprzedzony jest odpowiednim wstępem teoretycznym, a uzupełnieniem kursów jest słownik chemiczny. Układ e-kursów ściśle odpowiada przyjętemu programowi nauczania chemii, a w realizację projektu zaangażowani zostali wykładowcy z wieloletnim stażem, co zagwarantowało iż wprowadzane przykłady były reprezentatywne i stanowiły swoistą odpowiedź na najczęściej zgłaszane pytania na „tradycyjnych” konsultacjach. Dodatkowo w kursie Chemia analityczna do każdego zadania dołączono opis zatytułowany ‘analiza zadania’ zawierający omówienie sposobu rozwiązania problemu, skonstruowany tak, aby nakierowywać studenta na właściwy schemat rozwiązania zadania. Moduł interaktywnego rozwiązania zadania składa się z szeregu następujących po sobie pytań oraz podpowiedzi. Moduł ten pozwala studentowi na interaktywne włączenie się do rozwiązywania zadania. Udzielenie poprawnej odpowiedzi pozwala studentowi na przejście do następnego etapu aż do otrzymania finalnego wyniku lub odpowiedzi. W przypadku błędnych odpowiedzi generowane są podpowiedzi zawierające uwagi, dodatkowe materiały teoretyczne, potrzebne wzory, etc. [20, 21].

Ciekawostką jest, iż w semestrze jesiennym 2009 w oparciu o e-korepetytora został uruchomiony pierwszy na Wydziale Chemicznym w pełni internetowy kurs *Chemia Ogólna - ćwiczenia*, przeznaczony dla 64 studentów „zdalnych”, którzy nie uczestniczyli w tradycyjnych ćwiczeniach rachunkowych w salach lekcyjnych, lecz kontaktowali się z prowadzącymi ćwiczenia poprzez sieć Internet. Studenci zdalni zyskali możliwość uczenia się w dogodnym dla nich czasie i tempie, a prowadzący mogli śledzić postępy studentów zdalnych monitorując ich aktywność oraz uzyskane przez nich wyniki zadań testowych. Co istotne, zarówno studenci stacjonarni, jak i zdalni, mogli uczestniczyć w tradycyjnych konsultacjach, także przysłowiowy kontakt uczeń-nauczyciel nie został zerwany. Ponadto obie grupy studentów przystępowały na identycznych zasadach do e-kolokwium, którego zaliczenie było równoznaczne z zaliczeniem kursu z *Chemii Ogólnej – ćwiczenia*, a porównanie wyników egzaminu z obydwu grup studentów świadczyło o skuteczności opracowanej metody e-learningowej nauczania chemii [21].

Lekcja4_redoksometria

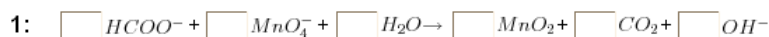
Próbkę technicznego kwasu mrówkowego o masie 0,2050 g rozpuszczono w wodzie i doprowadzono do odczynu lekko zasadowego. Do próbki dodano nadmiar roztworu KMnO_4 (HCOO^- , MnO_4^- , $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MnO}_2$, CO_2 , OH^-). Osad MnO_2 odsączono, przemyto i rozpuszczono w $75,00 \text{ cm}^3$ $0,0551 \text{ M}$ $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ w środowisku kwasu siarkowego(VI). (MnO_2 , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$, $\text{H}^+ \rightarrow \text{Mn}^{2+}$, CO_2 , H_2O). Nadmiar kwasu szczawiowego odmiareczkowano zużywając $24,65 \text{ cm}^3$ $0,02004 \text{ M}$ KMnO_4 .
Obliczyć procentową zawartość kwasu mrówkowego w próbce.
 $M(\text{HCOOH}) = 46,03 \text{ g/mol}$

Analiza zadania

Rozwiązanie zadania

Rys. 3.4.1. Przykład zadania z chemii analitycznej (redoksometria). Student ma możliwość przeanalizowania treści zadania lub podjęcia próby jego rozwiązania.

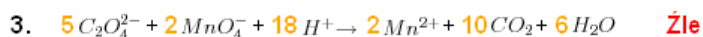
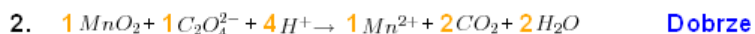
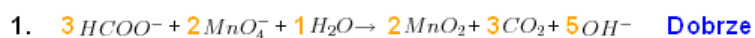
Dobierz współczynniki w reakcji 1, 2 i 3



Proszę wpisz swoją odpowiedź

Rys. 3.4.2. Etap pierwszy rozwiązania zadania: właściwe dobranie współczynników stechiometrycznych do równań chemicznych odpowiadających treści zadania.

Twoja odpowiedź :



Źle dobrane współczynniki

Kontynuuj

Rys. 3.4.3. W przypadku podania odpowiedzi nieprawidłowej, zostaje wyróżniona reakcja z nieprawidłowo dobranymi współczynnikami reakcji.

Kontynuacja daje możliwość zweryfikowania złej odpowiedzi.

3.3 E-kolokwia

Na wstępie warto się zastanowić, co zmieniło się w nauczaniu z początkiem XXI wieku? Starsi nauczyciele nierzadko z nostalgią wspominają czasy wykładów wspieranych notatkami zapisywanymi kredą na tablicy i „papierowych” kolokwiów, niemniej dziś za standard należy uznać ilustrowanie wykładów elektronicznymi prezentacjami bądź udostępnianie materiałów dydaktycznych za pośrednictwem internetu. Stopniowej zmianie uległ także system egzaminowania studentów. Jak stwierdzono, niewątpliwą zaletą e-kolokwiów jest możliwość uzyskania wyników bezpośrednio po zakończeniu egzaminu oraz obiektywność oceny. Niepodważalnym atutem e-kolokwiów jest także możliwość generowania unikalnych zestawów pytań np. poprzez losowanie ich z większej bazy pytań, mieszanie kolejności odpowiedzi w przypadku testów wyboru lub losowe dobieranie parametrów w zadaniach obliczeniowych. W publikacji poświęconej logistyce e-learningu [22] postawiono tezę, iż e-kolokwia wraz z losowym generowaniem pytań można uznać za odpowiedź na wszechobecny rozwój techniki. Wcześniej na ogół pytania egzaminacyjne były w „obiegu” przez około 3–4 lata, co wiązało się z „czasem życia” papierowych notatek i bardziej ograniczonym kontaktem między kolejnymi rocznikami studentów. Obecnie wystarczy moment, aby zrobić telefonem komórkowym zdjęcie tablicy, kartki z pytaniami lub ekranu monitora. Należy także mieć świadomość, że dziś studenci mają dostęp do specjalnych forów internetowych, na których często zaraz po egzaminie pojawiają pytania wraz z komentarzami i proponowanymi rozwiązaniami. Bazy pytań na forach internetowych gromadzą często zadania z wielu lat, co wymusza na prowadzących przygotowanie nowych zestawów [22]. Alternatywą jest tworzenie zadań, w których wprowadzenie szeregu parametrów losowych praktycznie gwarantuje niepowtarzalność e-testu.

Zniesienie ograniczeń związanych z czasem i miejscem rozwiązywania e-kolokwium, może być zarówno plusem, jak i minusem [23, 24]. W przypadku kolokwiów pisanych zdalnie, problemem jest weryfikacja tożsamości osoby rozwiązującej e-sprawdzian, oraz zweryfikowanie, czy przy rozwiązywaniu testu nie korzysta z pomocy osób trzecich lub dodatkowych materiałów. Z tego powodu przeważająca większość e-kolokwiów na Wydziale Chemicznym odbywa się pod nadzorem osób na pracowniach komputerowych Politechniki Wrocławskiej. Mimo problemów z weryfikacją tożsamości kilka zespołów dydaktyczny zdecydowało się udostępnić testy zdalne, dzięki którym studenci mogli zdobyć dodatkowe punkty i dodatkowo motywowało studentów do

systematycznej pracy*. Co ciekawe w większości przypadków wyniki kolokwium zaliczeniowych pod nadzorem były zbliżone do quizów rozwiązywanych przez studentów zdalnie [25]. Warto też wspomnieć, że dzięki quizom internetowym, w kolokwiach mogli uczestniczyć studenci przebywający na wymianie zagranicznej. Pisali oni kolokwium pod nadzorem swoich zagranicznych opiekunów, w tym samym czasie i na identycznych zasadach, co ich koledzy w Polsce.

Istotnym zagadnieniem związanym z e-learningiem są kwestie bezpieczeństwa. Na Politechnice Wrocławskiej, każdy ze studentów pierwszego roku otrzymuje indywidualne konto e-mail, którego nazwa powiązana jest z unikalnym numerem albumu studenta. Hasła wykorzystywane do dostępu do kont e-mail, są jednocześnie wykorzystywane do logowania do portali dydaktycznych i są one fizycznie przechowywane w jednym miejscu (serwer LDAP). Najbardziej newralgicznymi okresami związanymi z pracą e-portali dydaktycznych są terminy e-kolokwium, kiedy to duża część użytkowników jednocześnie uruchamia quizy testowe, a od niezawodności i pewności połączeń internetowych często zależy przebieg e-kolokwium. Zważywszy, iż podczas naboru w roku 2010 przyjęto na Politechnikę Wrocławską ponad dziewięć tysięcy studentów, z których większość uczestniczyła w e-kolokwiach z przedmiotu *Algebra z analizą matematyczną*, do przeprowadzania masowych e-egzaminów okazało się konieczne zbudowanie odpowiedniej infrastruktury technicznej. Bezproblemowy przebieg e-kolokwium na Politechnice Wrocławskiej zapewnia Dział Kształcenia na Odległość, a kolokwia odbywają się na czterech trzydziesto stanowiskowych pracowniach komputerowych dedykowanych do przeprowadzania e-kolokwium. Pracownie wyposażone są w terminale obsługujące jedynie połączenia z serwerem dydaktycznym znajdującym się w tym samym budynku, co zapewnia szybkość połączenia i odcięcie połączeń lokalnych od sieci zewnętrznej. W przypadku kolokwium odbywających się na pracowniach wydziałowych deklarowane są numery IP identyfikujące komputery przeznaczone do przeprowadzania e-testów, co ogranicza możliwość zdawania egzaminu z zewnątrz. W związku z tym, że egzaminy pod nadzorem odbywają się w obrębie jednego kampusu, w przypadku prób włamania z zewnątrz lub ataku hackerskiego, np. typu DDoS, możliwe jest zawężenie ruchu internetowego jedynie do transakcji serwer – uwierzytelnione

* Zaskakującym było udostępnienie studentom przez zespół fizyki zadań egzaminacyjnych na tydzień przed egzaminem! W istocie jednak okazało się to motywacją dla studentów do prób rozwiązywania zadań, a więc do nauki. Ponieważ zadania zawierały parametry losowe, studenci nie mogli nauczyć się na pamięć samych wyników liczbowych będących rozwiązaniami zadań, lecz musieli przyswoić sobie sposób rozwiązania zadania, co w istocie było założeniem kursu [25]

pracownie komputerowe, co przetestowano praktycznie. Ponieważ przy wejściu na pracownie sprawdzane są dane studentów, a w systemie zapisywane są takie dane jak czas i miejsce skąd rozwiązywano test (numer IP komputera), możliwa jest także późniejsza weryfikacja osób zdających kolokwium. Dodatkowo dla we wszystkich kolokwium (także zdalnych) przyjęto, iż dostęp do nich mają jedynie studenci zapisani na dany kurs w ściśle wyznaczonych ramach czasowych. W roku 2012 wprowadzono także system monitorowania pracowni komputerowych przy użyciu zainstalowanych kamer internetowych.

Inną często pomijaną kwestią związaną z bezpieczeństwem jest publikacja wyników e-kolokwiów. Można mieć wątpliwości, czy popularne wywieszanie „na drzwiach” ocen z numerami albumów jest zgodne z ustawą z dnia 29 sierpnia 1997 r. o ochronie danych osobowych, skoro część studentów zna numery albumów swoich kolegów lub nierzadko przed dziekanatami wywieszane są listy studentów zawierające ich nazwiska i numery albumów. Zgodnie z rekomendacją nr 1/2011 Administratora Bezpieczeństwa Informacji na Politechnice Wrocławskiej z dnia 18.02.2011 prof. Jerzego Walendziewskiego, „w największym uproszczeniu rzeczy ujmując dane osobowe stanowią wszelkie informacje, które pozwalają na ustalenie osoby, które te dane dotyczą”. Wszystkie te wątpliwości znikają w przypadku systemu e-kolokwiów, gdyż każdy ze studentów ma dostęp jedynie do własnych wyników uzyskanych na kolokwium. Istotnym dla osób przygotowujących zajęcia może być także określenie, jakie informacje student może zobaczyć bezpośrednio po zakończeniu e-kolokwium oraz później, po zamknięciu quizu. Przykładowo, zgodnie z rysunkiem 3.5, możemy ustalić, że po każdej próbie student otrzymuje komplet informacji, natomiast po zamknięciu quizu i logowaniu się z domu widzi jedynie ilość uzyskanych na e-kolokwium punktów.

Opcje przeglądu ?

Natychmiast po próbie*	Później, gdy quiz jest wciąż otwarty*	Po zamknięciu quizu*
<input checked="" type="checkbox"/> Udzielone odpowiedzi	<input type="checkbox"/> Udzielone odpowiedzi	<input type="checkbox"/> Udzielone odpowiedzi
<input checked="" type="checkbox"/> Poprawne odpowiedzi	<input type="checkbox"/> Poprawne odpowiedzi	<input type="checkbox"/> Poprawne odpowiedzi
<input checked="" type="checkbox"/> Informacja zwrotna	<input type="checkbox"/> Informacja zwrotna	<input type="checkbox"/> Informacja zwrotna
<input checked="" type="checkbox"/> Ogólna informacja zwrotna	<input type="checkbox"/> Ogólna informacja zwrotna	<input type="checkbox"/> Ogólna informacja zwrotna
<input checked="" type="checkbox"/> Punkty	<input checked="" type="checkbox"/> Punkty	<input checked="" type="checkbox"/> Punkty
<input checked="" type="checkbox"/> Całościowa informacja zwrotna	<input type="checkbox"/> Całościowa informacja zwrotna	<input type="checkbox"/> Całościowa informacja zwrotna

* Ukryj zaawansowane

Rys. 3.5. Konfiguracja widoku informacji zwrotnej dostępnej dla studenta.

Na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej system elektronicznego egzaminowania studentów powszechnie wykorzystuje pięć zespołów: Biochemii,

Biotechnologii, Chemii Ogólnej, Chemii Fizycznej oraz Fizyki. Każdy z tych zespołów opracował własny zbiór pytań egzaminacyjnych i we wszystkich e-kolokwiach zadania są losowane z większej puli pytań, tak aby były reprezentatywne dla określonego zakresu materiału. Mimo iż wszystkie e-kolokwia opierają się na platformie Modle [26], to każdy z zespołów opracował własną strategię przeprowadzania e-kolokwiów (tab. 3.1), a sprawdziany różnią się np. typem pytań użytych w przygotowanych quizach. Przykładowo e-kolokwia z biochemii i biotechnologii opierają się głównie na testach pojedynczego lub wielokrotnego wyboru, jednak zarówno kolejność pytań jak i kolejność odpowiedzi wewnątrz pytania jest określana w sposób losowy. W kursach z chemii ogólnej, chemii fizycznej i fizyki przeważają natomiast pytania obliczeniowe, w których parametry takie jak ilość i stężenie substancji, temperatura, ciśnienie określone są w sposób losowy. Dodatkowo w kursie z chemii ogólnej zawarte są pytania stechiometryczne, w których studenci dobierają współczynniki reakcji oksydoredukcyjnych* (rys. 3.4.2 oraz 3.6.1) [27, 28]. Natomiast w quizach z przedmiotów biochemicznych, wykorzystywane są także pytania, w których studenci proszeni są o wprowadzenie (narysowanie) struktury danego związku chemicznego (rys. 3.6.2). W części pytań zawarto elementy graficzne, jak rysunki lub schematy procesów, co pozwala sprawdzić, czy student jest w stanie prawidłowo odczytać i zinterpretować przedstawione w ten sposób dane[†]. Ponadto dzięki użyciu tych elementów zadania mogą być bardziej atrakcyjne, a oprócz wiedzy czysto teoretycznej, mogą kontrolować umiejętności „bardziej praktyczne”, jak np. czy student potrafi prawidłowo odczytać ilość zużytego do miareczkowania tritranu? (rys. 3.6.3).

Na kontrowersyjne rozwiązanie zdecydował się zespół fizyki, który zdecydował się udostępnić bazę pytań przed egzaminem! Świadomość, iż zadania egzaminacyjne są dostępne przed egzaminem skłoniła większość studentów do wielokrotnego rozwiązywania quizów próbnych z Fizyki I oraz Fizyki II. Quizy te były dostępne bez ograniczeń *on-line* przed egzaminem zaliczeniowym i zawierały pięć pytań każdorazowo losowanych z opracowanej bazy pytań. W związku z tym, iż pytania zawierały parametry losowe, studenci nie mogli nauczyć się jedynie wyników liczbowych, lecz musieli przyswoić sobie algorytm rozwiązania poszczególnych zadań. W przypadku bazy zadań liczącej kilkaset problemów z fizyki, studenci dysponujący doskonałą pamięcią mogą oczywiście

* Pytania te wykorzystują specjalnie opracowany na potrzeby Wydziału Chemicznego moduł „pytań stechiometrycznych”, pozwalający także na tworzenie pytań związanych z określaniem stopnia utlenienia.

[†] Przykładowo rysunki przedstawiające diagramy fazowe mogą być generowane w programie *gnuplot* [29] z użyciem parametrów losowych na podstawie odpowiednich wzorów, co dodatkowo gwarantuje niepowtarzalność testów.

spróbować opanować kilkaset algorytmów rozwiązania poszczególnych zadań, jednak łatwiej jest nauczyć się fizyki, co w istocie jest założeniem kursu.

Tabela 3.1. Różnice w kolokwiach przygotowanych przez poszczególne zespoły dydaktyczne. W przypadku zespołów prowadzących kilka kursów z e-kolokwiami przedstawiono dane dla jednego, wybranego kursu z każdej grupy.

Zespół dydaktyczny	Fizyki	Chemii ogólnej	Chemii fizycznej	Biochemii	Biotechnologii
ilość kursów z e-kolokwiami	2	1	3	4	6
typy pytań	obliczeniowe	obliczeniowe i stechiometryczne	obliczeniowe	głównie wielokrotnego wyboru	pojedyncza odpowiedź
dostęp do pytań przed egzaminem	tak	nie ^a	tylko 10%	nie	nie
ilość pytań w teście	5	5 (I kolokwium) 3 (II kolokwium)	5	25	30
czas [min]	55	60	75	60	30
ilość prób odpowiedzi na jedno pytanie	3	4	4	1	1
kolokwia „pod nadzorem”	tak	tak	tak + dodatkowe e-testy pisane zdalnie	tak	tak
ilość podejść do egzaminu poprawkowego	1	1	2	pisemny egzamin poprawkowy	1 lub 2
ilość podejść studentów w połowie semestru zimowego 2011	703	611	344	182	196
ilość podejść studentów na końcu semestru zimowego 2011	677	556	268	156	148
ilość wszystkich podejść wraz z egzaminem poprawkowym	1673	1355	996	344	494

^a- studenci mają dostęp do elektronicznego korepetytora zawierającego reprezentatywne przykłady zadań z e-kolokwium.

Warto też podkreślić, iż system quizów, można wykorzystać nie tylko do przeprowadzania e-kolokwiów, ale może być ona znakomitym narzędziem do samooceny pracy studenta. Przykładowo studenci kursu Biochemia I muszą opanować strukturę wszystkich podstawowych aminokwasów białkowych. W tym przypadku znakomicie sprawdza się udostępniony studentom quiz, w którym muszą oni narysować strukturę wszystkich wymaganych na kolokwium aminokwasów (rys. 3.6.2) [20].

1 Dobierz współczynniki stechiometryczne w równaniu reakcji:
 $SnO_2 + Na_2CO_3 + S = Na_2SnS_3 + SO_2 + CO_2$
 Punkty: -/1

1 : SnO_2 + Na_2CO_3 + $S =$ Na_2SnS_3 + SO_2 + CO_2

Zatwierdź

2 Narysuj wzór tryptofanu (indoliloalaniny).
 Punkty: -/1

Odpowiedź:

Answers must be written in the SMILES chemical markup language. You can use the JME editor to create a structure interactively, and then use the "Insert from editor" buttons to insert the code into the answer boxes.

JME Editor
 courtesy of
 Peter Ertl,
 Novartis

Answer:

Zatwierdź

3 Na podstawie zdjęcia, określ ilość roztworu zużytego do miareczkowania mieszaniny (tritrantu), przyjmując, iż biureta była prawidłowo napełniona na podziałki górnej 0 cm³.
 Punkty: -/1

Wybierz odpowiedź

a. 24.2

b. 24.3

c. 25.4

d. 25.7

Zatwierdź

Rys. 3.6. Przykłady typów pytań z chemii (3.6.1 - pytanie stechiometryczne, 3.6.2 - pytanie związane z wprowadzeniem struktury związku chemicznego, 3.6.3 - test pojedynczego wyboru powiązany z ilustracją graficzną).

Jak wspomniano, niewątpliwym plusem e-kolokwiów jest efektywne, obiektywne i szybkie ocenianie znacznej liczby studentów. Przed wprowadzeniem e-kolokwiów, sprawdziany zaliczeniowe z chemii ogólnej były sprawdzane ręcznie, co przy ponad 600 osobach zapisanych na kurs, powodowało iż studenci otrzymywali oceny swoich prac po blisko tygodniu. Obecnie ocena wystawiana jest automatycznie, a tym samym studenci mają o tydzień więcej czasu na przygotowanie się do ewentualnego egzaminu poprawkowego [22]. Wielokrotnie podkreślanym atutem e-kolokwiów jest także możliwość losowego generowania pytań, co pozwala na wygenerowanie dla każdego studenta unikalnego zestawu pytań [30].

Za największy minus e-kolokwium przyjmuje się, że system ocenia jedynie sam wynik końcowy podany przez studenta, a nie sposób rozumowania. W rzeczywistości jednak większość zespołów naukowych przygotowała specjalne quizy próbne, dzięki którym student może bez ograniczeń praktykować rozwiązywanie zadań. Natomiast podczas e-kolokwium zaliczeniowego osoba, która ma uzyskać w przyszłości tytuł magistra inżyniera powinna podać wynik bezbłędnie, ponieważ od poprawności i staranności obliczeń może zależeć bezpieczeństwo i realizacja przyszłych projektów. Niestety część studentów uważa, że poprawne napisanie wzoru powinno być punktowane, nie przywiązując większej uwagi do staranności i poprawności obliczeń. Tymczasem zarówno przy projektowaniu procesów chemicznych i technologicznych, jak i w pracy laboratoryjnej staranność obliczeń jest niezwykle ważna. Ukłonem, w stosunku do studentów jest możliwość kilkukrotnego podawania wyniku końcowego, co premiuje osoby, które potrafią znaleźć błąd w swoim rozumowaniu. Należy przyjąć, że osoba która kilkakrotnie podaje zły wynik rozwiązania zadania, albo „strzela”, albo rzeczywiście nie potrafi samodzielnie go rozwiązać. Zawsze jednak w przypadku wątpliwości na podstawie brudnopisu, możliwe jest przeanalizowanie sposobu rozwiązania zadania i ewentualne uwzględnienie reklamacji* [31]. Jak wspomniano dobrą praktyką na Wydziale Chemicznym podczas e-kolokwiów jest rozdawanie przez prowadzących kartek, które są brudnopisami dla studentów przy rozwiązywaniu zadań i które mogą być podstawą do ewentualnych reklamacji studentów. Ponieważ zaraz po zakończeniu rozwiązywania testu studenci znają swoje wyniki, mogą więc zgłosić osobie nadzorującej wątpliwości związane

* Na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej przyjęto zasadę, iż podczas e-kolokwium studenci mają do dyspozycji podpisane i oznaczone kartki papieru, które są brudnopisami. W przypadku wszelkich wątpliwości, brudnopis ten jest podstawą reklamacji. Na jego podstawie osoba nadzorująca przebieg e-kolokwium lub osoba prowadząca zajęcia z danym studentem może przedstawić sposób rozwiązania studenta i ewentualnie skorygować ocenę punktową zadania.

z rozwiązaniem konkretnego zadania. Statystycznie reklamacje i inne zastrzeżenia związane z zadaniami dotyczyły mniej niż 5% prac, a więc mogły być one rozpatrzone bądź na e-kolokwium lub bezpośrednio po jego zakończeniu, bądź na konsultacjach. W uzasadnionych przypadkach, już po złożeniu e-kolokwium, studenci mieli także możliwość napisania na czysto rozwiązania spornego zadania celem przedłożenia do reklamacji. Satysfakcjonujące, iż podczas przepisywania „na spokojnie” brudnopisu na czysto, większość studentów sama potrafiła dostrzec błędy w swoich rozwiązaniach.

Drugim często podnoszonym mankamentem związanym z nauczaniem przez Internet jest brak możliwości wyłonienia osób wybitnych przy elektronicznym egzaminowaniu. Jednak kilkuletnia praktyka w prowadzeniu e-kolokwiów pokazała coś innego. W prosty sposób można wskazać osoby które w ciągu kilku minut bezbłędnie rozwiązały e-kolokwia przewidziane na znacznie dłuższy czas*. Analizując wyniki uzyskane przez studentów w testach próbnych, można także wskazać grupę studentów pracowitych, którzy, rozwiązywali znaczną ilość testów i u których widać progres w ilości rozwiązanych zadań [31, 32, 33]. Uwzględniając dodatkowo ilość czasu spędzonego przez studentów nad rozwiązywaniem wszystkich quizów przygotowawczych, czas rozwiązywania poszczególnych zadań, liczbę podejść oraz progres uzyskanych ocen, można wytypować:

- ✚ studentów wybitnych – pojedyncze osoby rozwiązały bezbłędnie kolokwium przewidziane na 55 minut w czasie około 3 minut ; osobom tym, po rozmowie potwierdzającej ich wiedzę, można zaproponować indywidualny tok nauczania lub udział w projektach badawczych;
- ✚ studentów bardzo dobrych – którzy kilkakrotnie rozwiązały poprawnie quiz testowy i z powodzeniem zaliczyły kolokwia zaliczeniowe;
- ✚ studentów pracowitych – którzy często spędzali kilka godzin dziennie nad quizami testowymi i u których widać postęp w liczbie poprawnie rozwiązanych zadań.

* Korzystając z rozwiązań elektronicznych można wręcz w prosty sposób premiować studentów, którzy w najkrótszym czasie poprawnie rozwiążą e-testy. Interesującym eksperymentem dydaktycznym jest przyzwolecie, aby studenci podczas e-egzaminów mogli korzystać z książek i aby mogli się z sobą kontaktować. Osoby lepiej zaznajomione z materiałem kursu prawdopodobnie szybciej rozwiążą zadania testowe lub szybciej znajdą w swoich notatkach wskazówki do ich rozwiązania. W tym przypadku odchodzimy od „uczenia się wszystkiego na pamięć”, lecz premiujemy studentów, którzy są potrafią najszybciej rozwiązać dany problem korzystając z dostępnych źródeł. Natomiast możliwość porozumiewania się pomiędzy uczestnikami e-kolokwium, zmusza „liderów grup” do decyzji, czy pomagać słabszym kolegom w rozwiązaniu ich zadań, czy szybciej skończyć e-test i tym samym samemu uzyskać lepszą ocenę.

Dla osoby prowadzącej kurs równie istotna może być analiza aktywności osób, które nie zaliczyły kursu. W przypadku kursu z fizyki można wytypować cztery główne grupy:

- ✚ studentów, którzy nie podeszli do kolokwium testowego lub poświęcili nauce zbyt mało czasu;
- ✚ studentów, którzy otwierali quiz testowy często tylko na kilka sekund, aby wykonać „*print-screeny*” lub sprawdzić powtarzalność zadań;
- ✚ studentów niemających predyspozycji do zaliczenia kursu – poświęcili oni znaczną ilość czasu na przygotowanie do kolokwiów, jednak nakład ich pracy nie przełożył się znacząco na uzyskiwane przez nich wyniki; tacy studenci powinni zostać skierowani na konsultacje i kursy wyrównawcze;
- ✚ „studentów-pechowców”, którzy poprawnie rozwiązywali kolokwia testowe, jednak nie zaliczyli kolokwium zaliczeniowego; warto tu zaznaczyć, że niektórzy „pechowcy” przyznali, iż poprawnie rozwiązywali zadania w domu, ponieważ mogli korzystać z notatek i wyprowadzonych wzorów, natomiast na kolokwium mieli problem z rozwiązaniem zbliżonych zadań, bowiem odbywało się ono pod nadzorem, bez dostępu do dodatkowych pomocy naukowych.

Istotny jest fakt, wykładowca może mieć dostęp nie tylko do ocen studenta, ale może również zweryfikować jego postępy i systematyczność pracy. Należy jednak przestrzec przed ślepym wykorzystywaniem narzędzi statystycznych. U części studentów, którzy z powodzeniem rozwiązywali kolokwium zaliczeniowe, można było zaobserwować wyraźny regres. Początkowo rozwiązywali oni wszystkie zadania w quizach testowych, ale później liczba rozwiązanych zadań w kolejnych podejściach systematycznie malała. Okazało się, że studenci ci w kolejnych odsłonach quizu przygotowawczego podchodzili jedynie do zadań, które budziły ich wątpliwości, pomijając typy zadań, które wcześniej opanowali.

Warto także zastanowić się, czy sprawdzian ma służyć samoocenie danej osoby, czy być postawą do wystawienia oceny końcowej z przedmiotu? Przykładowo test z języka angielskiego rozwiązywany przez studenta zdalnie z domu, może być wskazówką dla niego samego, czy powinien zapisać się na zajęcia do grupy początkującej, średniozaawansowanej, czy zaawansowanej. Analogiczny test przeprowadzany pod nadzorem po zajęciach może być natomiast podstawą do wystawienia oceny z kursu.

3.5 Wnioski

Paradoksalnie rozwój „e-chemii” często przybliży chemię obliczeniową i doświadczalną. Od chemii obliczeniowej oczekujemy, że coraz trafniej będzie przewidywać różnorodne właściwości związków chemicznych, pozwoli na złożone obliczenia coraz większych układów oraz projektowanie nowych materiałów [5]. Natomiast chemikowi syntetyzującemu nowe związki chemiczne ułatwi projektowanie procesów chemicznych wskazując optymalne warunki prowadzenia reakcji. Już dziś często „przy biurku” projektuje się nowe związki oraz określa się drogę i warunki ich syntezy, a eksperymentalnie optymalizuje jedynie się warunki procesu. Warto też zauważyć, że obsługa aparatury pomiarowej, urządzeń badawczych, bądź linii technologicznych coraz częściej związana jest *de facto* z obsługą specjalistycznego oprogramowania komputerowego. Odpowiedzią Politechniki Wrocławskiej na zmieniające się wymogi rynku pracy, jest wzrastająca ilość zajęć komputerowych, gdyż coraz częściej przyszli pracodawcy wymagają od absolwentów Wydziału Chemicznego znajomości oprogramowania, wyszukiwania informacji naukowych oraz umiejętności zaprojektowania reakcji chemicznej czy procesu technologicznego na komputerze.

W niniejszej pracy przedstawiono trzy oblicza ‘e-chemii’ związane z chemią obliczeniową, inżynierią chemiczną oraz wybranym zagadnieniem związanym z dydaktyką i nauczaniem chemii. Śmiało można prognozować dalszy rozwój ‘e-chemii’, który dzięki ekspansji technik modelowania komputerowego i postępowi technologii chemicznych umożliwi tworzenie nowych generacji komputerów, a tym samym rozwój ‘e-technologii’.

3.6 Bibliografia – rozdział III

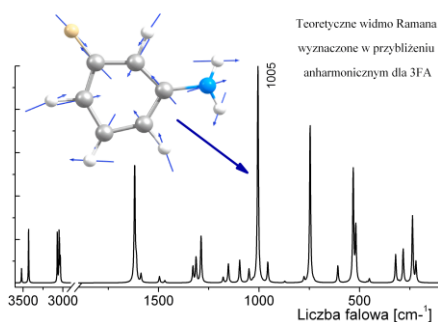
- [1] P. Wojciechowski; Wiadomości Chemiczne 66 (1012) 342-353.
- [2] Open AGH - repozytorium otwartych zasobów edukacyjnych (OZE) Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie <http://open.agh.edu.pl> ; w tym e-kurs: J. Banaś, W. SolarSKI, *E-chemia*, http://zasoby1.open.agh.edu.pl/dydaktyka/chemia/a_e_chemia
- [3] Portal Chemiczny Politechniki Rzeszowskiej, www.e-chemia.pl
- [4] Baza Reaxys[®], Reed Elsevier Properties SA., Elsevier Information Systems GmbH, Theodor-Heuss-Allee 108, D-60486 Frankfurt, The Federal Republic of Germany.
- [5] P. Iancu, M.C. Stroescu, A.M. Joşceanu, T.D. Danciu, O.C. Pârvulescu, C. Boscornea, L. Alexa; Chemical Engineering Transactions 29 (2012) 1075-1080.
- [6] Usługa Obliczeń Kampusowych PLATON U3, Politechnika Częstochowska, PCSS. Dostępna w Internecie: <http://cloud.pionier.net.pl>
- [7] Portal PL-Grid, Dostępny w Internecie: <http://www.plgrid.pl>
- [8] D. Yaron, C. Ashe, M. Karabinos, K. Williams, L. Ju; *Virtual Lab (Wirtualne laboratorium chemiczne)* National Science Digital Library (NSDL), Dostępne w Internecie: <http://www.chemcollective.org/vlab>
- [9] P. Sampaio, R. Mendonça, S. Carreira; Multimedia Tools and Applications (2012) 1-27.
- [10] Portal Wspierania Dydaktyki Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej <http://eportal-ch.pwr.wroc.pl>
- [11] D. Griol, J.M. Molina, A.S. de Miguel, Z. Callejas; Journal of Universal Computer Science 18 (2012) 2516-2541.
- [12] P. Wojciechowski, *Metodyka kursu internetowego „Desktop publishing z elementami HTML” dla studentów chemii*, konferencja Nowe media w edukacji (Wrocław, 28 stycznia 2005) 201-205.
- [13] P. Wojciechowski; Żak 83 (2009) 10-11.
- [14] P. Wojciechowski; Pryzmat 235 (2010) 37-38.
- [15] P. Wojciechowski, *Wybrane koncepcje e-learningu - prezentacja portalu elektronicznego wspomagania dydaktyki Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej*, 51 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego oraz Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, materiały konferencyjne (Opole, 7-11 IX 2008) 210.

- [16] P. Wojciechowski, *Portal elektronicznego wspomagania dydaktyki na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej - wybrane koncepcje e-learningu*, konferencja Nowe Media w Edukacji (Wrocław, 22 IX 2008) 157-163.
- [17] P. Wojciechowski, *Rola E-Learningu w nauczaniu na wyższych uczelniach*, portal Siła Wiedzy (8 kwietnia 2011).
- [18] J. Borkowska-Burnecka, R.W. Góra, P. Jamróz, B. Kołodziej-Kozłowska, B. Kułakowska-Pawlak, A. Leśniewicz, B. Prusisz, P. Rutkowski, E. Ingier-Stocka, P. Wojciechowski, J. Wódka, M. Zabłocka-Malicka, W. Zierkiewicz, B. Ziółek, *Metodyka nauczania zagadnień chemicznych w oparciu o system zarządzania kursami Moodle*, konferencja Wykorzystanie technologii informatycznych w dydaktyce chemii na poziomie szkoły wyższej, (Kraków, 18 czerwca 2007) 24-27.
- [19] P. Wojciechowski, J. Borkowska-Burnecka, R.W. Góra, P. Jamróz, B. Kozłowska-Kołodziej, B. Kułakowska-Pawlak, A. Leśniewicz, B. Prusisz, P. Rutkowski, E. Ingier-Stocka, J. Wódka, M. Zabłocka-Malicka, W. Zierkiewicz, B. Ziółek, *Nauczanie chemii z wykorzystaniem systemu Moodle*, 50 Jubileuszowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego oraz Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego - materiały konferencyjne (Toruń, 9-12 Wrzesień 2007) 308.
- [20] P. Wojciechowski; *E-mentor* 35 (2010) 32-35.
- [21] P. Wojciechowski, *E-nauczanie chemii na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej*, konferencja Nowe Media w Edukacji 2011 (Wrocław, 15 września 2011).
- [22] P. Wojciechowski, J. Rosak-Szyrocka; *E-mentor* 46 (2012) 56-63.
- [23] I. G. Niculescu-Aron, L. Asandului, M. Mazurencu, C. Mihăescu; *Informatica Economică*, 2(42) (2007) 45-50.
- [24] Piotr Wojciechowski; *E-mentor* 37 (2010) 29-35.
- [25] K. Rohleder, A. Lewanowicz, *e-ch fizyka; nowe formy kształcenia*, konferencja Nowe Media w Edukacji (Wrocław, 22 IX 2008) 93-100.
- [26] Moodle (*Modular Object-Oriented Dynamic Learning Environment*) – środowisko nauczania zdalnego za pomocą sieci teleinformatycznych, strony w sieci Internet: <https://moodle.org> oraz <http://moodle.pl>
- [27] S. Kotcherlakota, D.W. Brooks; *Journal of Science Education and Technology* 17 (2008) 297-304.
- [28] Z. Own; *International Journal of Science and Mathematics Education* 8 (2010) 1-23.
- [29] Projekt Gnuplot, <http://www.gnuplot.info>

- [30]F. Scheuermann, J. Björnsson, *The Transition to Computer-Based Assessment - New Approaches to Skills Assessment and Implications for Large-scale Testing*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, EUR – Scientific and Technical Research series, (2008). Dostępny w sieci Internet pod adresem: <http://crell.jrc.it/RP/reporttransition.pdf>
- [31]P. Wojciechowski, *System E-kolokwiów*, 165-180; Rozdział 17 w monografii wydanej pod redakcją Lesława Sieniawskiego; Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej (2012); ISBN 978-83-7493-720-7.
- [32]E.W. Black, K. Dawson, J. Priem; *Internet and Higher Education* 11 (2008) 65–70.
- [33]E. Sorensen; *European Journal of Engineering Education* (2013),
<http://dx.doi.org/10.1080/03043797.2012.760533>

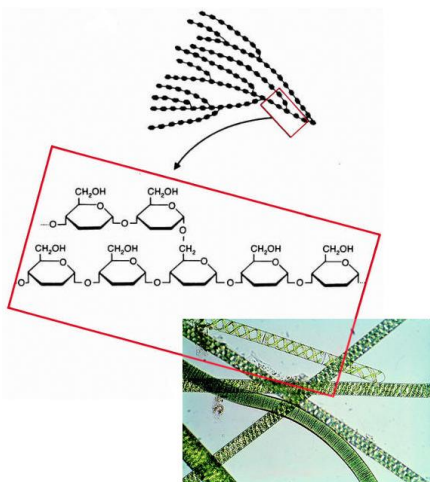
O e-książce

Ideą pracy było przedstawienie w formie niezależnych opracowań najbardziej dynamicznie rozwijających się zagadnień związanych z e-chemią oraz prezentacja możliwości wykorzystania narzędzi informatycznych zarówno w chemii obliczeniowej (modelowanie komputerowe), jak i w nauczaniu chemii. W poszczególnych rozdziałach skupiono się na konkretnych przykładach reprezentatywnych dla omawianych zagadnień.



Chemia kwantowa (strony 1 - 74)

Przykład prezentacji obliczeń kwantowych wykonanych metodą funkcjonału gęstości DFT dla cząsteczki aniliny i jej pochodnych. Omówienie analizy naturalnych orbitali atomowych oraz powiązanie widm oscylacyjnych (widma IR i Ramana) ze strukturą wybranych cząsteczek oraz z rozkładem energii potencjalnej PED.



Inżynieria chemiczna (strony 75 - 179)

Zestawienie dwóch modeli opisujących ewolucję układu: modelu iteracyjnego bazującego na mechanizmie reakcji enzymatycznej (preferencjach substratowych enzymów) z modelem fizycznym (kinetycznym) wyróżniającym poszczególne etapy procesu. W rozdziale przedstawiono konstrukcję poszczególnych modeli, jednocześnie pokazując jakich informacji o układzie dostarcza dany model.

E-learning (strony 180 – 200)



Prezentacja technik nauczania chemii z wykorzystaniem dostępnych mediów elektronicznych. W rozdziale skupiono się na problemie elektronicznej kontroli kompetencji studentów chemii, gdyż temat ten jest szeroko dyskutowany i budzi wiele kontrowersji zarówno wśród studentów, jak i wykładowców.

Prezentowane w pracy obliczenia na poziomie DFT wykonano
w Poznańskim oraz Wrocławskim Centrum Sieciowo-Superkomputerowym.
Rejestrację widm IR oraz Ramana przeprowadzono w Zintegrowanym Wydziałowym
Laboratorium Inżynierii i Badania Materiałów Zaawansowanych.



ISBN 978-83-938096-0-8