

АНАЛІЗ ВЗАЄМОДІЇ МОНОСАХАРИДІВ З АМІНОКИСЛОТАМИ В ХАРЧОВІЙ СИРОВИНІ КВАНТОВО-ХІМІЧНИМИ МЕТОДАМИ

Попова І. В., Майборода О. І., Сімурова Н. В., Кармашов О. О.

Об'єктом дослідження є продукти гідролізу полісахариду інуліну (глюкоза, фруктоза) рослинної сировини, що використовуються для виробництва харчових продуктів оздоровчо-профілактичного призначення. Пошук оптимальних умов перетворення полісахаридів у процесах гідролітичного розщеплення на фруктозо-олігосахаридні продукти вимагає ретельного вивчення як хімічного складу сировини, так і взаємодії між компонентами. Це впливає як на стабільність вихідних, проміжних та кінцевих продуктів гідролізу полісахариду, так і на його вивільнення з рослинної сировини та на подальший перебіг його фрагментації. Літературні дані свідчать про те, що хімічний склад вуглеводовмісної рослинної сировини, зокрема вміст мінеральних компонентів, вивчений ще не повністю та вимагає додаткових досліджень і уточнень. Адже макро- та мікроелементи в його складі не тільки є важливими нутрієнтами, але й можуть брати активну участь у перетвореннях органічних компонентів шляхом комплексоутворення на проміжних стадіях цих процесів. Крім того, вимагає до себе уваги і питання можливої взаємодії органічних сполук у складі харчової сировини, зокрема біополімерів, що складають значну частину маси – вуглеводів і білкових сполук. Така взаємодія за звичайних умов практично не вивчалася, але може впливати на перебіг технологічних процесів переробки. Дослідження міжмолекулярних взаємодій, що відбуваються у складних природних системах, часто ускладнюється або відсутністю прямих (селективних) фізичних і фізико-хімічних методів дослідження, або багатоконпонентністю хімічного складу системи, або ж складністю самих об'єктів (речовин) дослідження. Особливо це стосується природних речовин полімерної природи – білків, пептидів, полі- та олігосахаридів. Тому у роботі було приділено особливу увагу вивченню взаємодії цих компонентів. За допомогою квантово-хімічного моделювання досліджено просторову будову молекул інуліну, олігосахаридів та елементарних ланок цих полімерів. Розраховано розподіл ефективних зарядів на атомах вуглеводів, що безпосередньо впливає на їх реакційну здатність. А також створені квантово-хімічні моделі взаємодії білкових речовин рослинної сировини з вуглеводами у вакуумі та в водних розчинах залежно від їх розведення.

Ключові слова: гідроліз полісахариду, олігосахариди, амінокислоти, квантово-хімічне моделювання, ефективні заряди, цукрозамінники, хімічні зв'язки.

1. Вступ

Найбільш розповсюдженими серед цукрозамінників вуглеводної групи, що масово виробляються та застосовуються в харчовій промисловості багатьох

країн, є глюкозо-фруктозні сиропи. Зазвичай, такі продукти позначають аббревіатурою ГФС. Відповідно, глюкозні сиропи з підвищеним вмістом фруктози, або ж високофруктозні сиропи позначаються аббревіатурою ВФС. Залежно від вмісту фруктози ці сиропи іноді називають ГФС першого, другого та третього покоління.

Останнім часом поширюється розробка способів виробництва продуктів часткового гідролізу інуліновмісної сировини, що має ряд переваг перед виробництвом чистої фруктози на основі тих самих інулінвмісних продуктів [1, 2].

Відомі впроваджені ефективні технології, що ґрунтуються на гідролізі інуліну, розроблені на стику різних наук – фізики, хімії, біології, ензимології. Вважаємо, що така розробка вимагає ретельного вивчення фізики-хімічних характеристик інуліну, його будови, зокрема просторової будови, а також застосування сучасного математичного та квантово-хімічного апарату, оскільки на сучасному етапі розвитку наукових досліджень розроблення технології неможливе без попереднього вивчення теоретичних аспектів будови та властивостей задіяних в технологічному процесі сполук.

Крім того, вимагає до себе уваги і питання можливої взаємодії органічних сполук у складі рослинної харчової сировини, зокрема біополімерів, що складають значну частину – вуглеводів і білкових сполук. Така взаємодія за звичайних умов практично не вивчалася, але може впливати на перебіг технологічних процесів переробки вуглеводвмісної сировини.

У науковій літературі для позначення продуктів, що містять або складаються з полімергомолів інуліну меншого ступеня полімеризації, немає єдиних підходів до термінології. Деякі автори вживають узагальнену назву полісахаридів, полімерний ланцюг яких складається з фруктозних – залишків «фруктани». Але така назва не несе інформації ні щодо циклічної та аномерної форми фруктози (наприклад, β -D-фруктофураноза, β -D-фруктопіраноза), ні щодо типу глікозидних зв'язків між цими залишками, ні щодо довжини полімерного ланцюга. Наприклад, у молекулах інуліну та його полімергомолів між β -D-фруктофуранозними залишками здійснюється 1 \rightarrow 2 глікозидний зв'язок, в той же час як у молекулі левана 2 \rightarrow 6 глікозидний зв'язок, але і леван, і інулін є фруктанами [3, 4].

Тому актуальним є вивчення взаємодії окремих хімічних компонентів сировини. Таким чином, *об'єктом дослідження* обрано продукти гідролізу полісахариду інуліну (глюкоза, фруктоза) рослинної сировини, що використовуються для виробництва харчових продуктів оздоровчо-профілактичного призначення. *А мета роботи* полягає в аналізі та вивченні взаємодії рекомбінацій полімергомолів інуліну меншого ступеня полімеризації з амінооцтовою кислотою.

2. Методика проведення дослідження

Дослідження міжмолекулярних взаємодій, що відбуваються у складних природних системах, часто ускладнюється або відсутністю прямих (селективних) фізичних і фізико-хімічних методів дослідження, або багатокомпонентністю хімічного складу системи, або ж складністю самих

об'єктів (речовин) дослідження. Особливо це стосується природних речовин полімерної природи – білків, пептидів, полі- та олігосахаридів. Тому останнім часом для дослідження такого роду об'єктів з успіхом використовуються методи квантово-хімічного моделювання, які базуються на рішенні рівняння Шредінгера для молекулярних систем. При цьому враховуються усі можливі взаємодії, які можуть відбуватися між ядрами та електронами атомів, що утворили сполуку. В результаті квантово-хімічних розрахунків одержують просторову будову (розміщення один відносно одного атомів) та фізичні характеристики системи (відстані між атомами, кути, енергії зв'язків, ентальпії утворення) в локальному енергетичному мінімумі [5].

Для квантово-механічного моделювання процесів можливої взаємодії вуглеводів, що є складовими частинами інуліну був використаний набір комп'ютерних спеціалізованих програм «HyperChem» версії 7.7.

Перший крок квантово-хімічного моделювання проводився з використанням напівемпіричного методу MNDO (Modified Neglect of Diatomic Overlap – модифіковане нехтування двоатомним перекриттям) у параметризації PM3 (Parametric method Number 3), що дозволяє поряд з оптимізацією геометрії розраховувати розподіл ефективних електростатичних зарядів на атомах, що входять до складу молекули. Основну увагу при цьому приділяли значенню ефективних зарядів на атомах Оксигену та Гідрогену гідроксильних груп як потенційних центрів взаємодії для утворення водневих зв'язків [6, 7].

Оскільки в методі молекулярної механіки атоми розглядаються як ньютонівські частки, що взаємодіють одна з одною завдяки потенціальним полям (у даному випадку електростатичних), то потенціальна енергія взаємодії залежить від довжин зв'язків, кутів між зв'язками, торсійних кутів і нековалентних взаємодій. Тому робочим силовим полем (потенціальною функцією) для розрахунків був обраний метод AMBER (один із методів молекулярної механіки для моделювання динаміки органічних молекул), орієнтований на органічні молекули та амінокислоти [8–10].

Для оптимізованої методом молекулярної механіки геометрії системи проводився розрахунок можливості утворення водневих зв'язків та його енергії.

Оскільки взаємодія у реальних природних системах відбувається переважно у водних розчинах, де значний вплив на перебіг процесів має розчинник, необхідним було врахувати можливий вплив води на міжмолекулярні взаємодії у системі моносахарид-амінооцтова кислота. Тому оптимізовану, як описано вище, систему молекул вміщували у періодичний бокс (умовний одиничний об'єм), рівномірно заповнений молекулами води (від 50 до 700 молекул). Диполі води власними електростатичними полями впливають на молекули розчиненої речовини (сольватаційні взаємодії, дисперсійні взаємодії тощо). Далі проводили оптимізацію геометрії системи моносахарид-амінооцтова-вода. Після чого знову проводився розрахунок водневих зв'язків за умови, що мінімальна довжина між молекулами розчинника та сольватованими атомами повинна бути 2,3 Å [11].

3. Результати дослідження та обговорення

При моделюванні можливої взаємодії сахаридів з амінооцтовою кислотою з утворенням асоціатів зв'язаних водневими зв'язками необхідним було вирішити наступні питання:

- які з гідроксильних груп реально приймають участь в утворенні водневих зв'язків;
- яка з груп амінокислоти карбоксильна чи аміно утворюватиме водневі зв'язки зі спиртовими групами сахаридів;
- які з утворюваних зв'язків будуть найміцнішими.

На першому етапі квантово-механічного моделювання необхідно було вирішити питання про найбільш імовірну будову молекул інуліну у твердому стані та в розчині.

Оскільки синтез полісахаридів у рослинах відбувається за рахунок ряду послідовних реакцій поліконденсації, коли молекула нарощується за рахунок приєднання залишку базового моносахариду, для моделювання був обраний метод молекулярного нарощування. Суть методу полягала в тому, що до молекули сахарози приєднувався залишок фруктози та для одержаної молекули проводився пошук найбільш стійкої геометрії. Одержану оптимізовану геометрію використовували як базис для приєднання наступної молекули фруктози та знову проводили пошук оптимізованої геометрії. Нарощування продовжували до входження до модельної молекули 20 залишків фруктози.

Як показали розрахунки, при поступовому нарощуванні молекули від 1 до 6–8 залишками фруктози переважно формується спіралеподібна структура. Отримана молекула стабілізується за рахунок водневих зв'язків, що утворюються між атомами гідрогену переважно первинних гідроксогруп фруктози та ефірними атомами Оксигену, що зв'язує залишки фруктози (рис. 1).

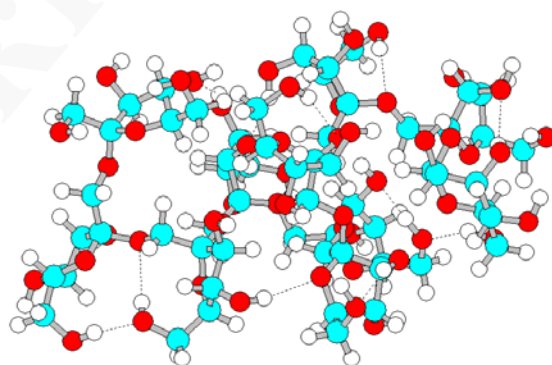


Рис. 1. Оптимізована геометрія молекули олігосахариду з 8 нарощеними залишками фруктози

Подальше нарощування ланцюга залишками фруктози призводить до ще більшого ускладнення геометрії ланцюга, яка починає перетворюватися на глобулярну.

З одержаних результатів можна зробити припущення, що подальше збільшення кількості залишків фруктози у молекулі збільшить глобулярність геометрії. Таким чином для твердого інуліну не можна очікувати строго

впорядкованої геометрії. Проте, як відомо, у розчині геометрія складних полімерних молекул може змінюватися за рахунок взаємодії з молекулами розчинника (сольватація) та за рахунок електростатичного впливу на внутрішньо молекулярні водневі зв'язки (дисперсійні взаємодії). Тому була проведена оптимізація геометрії молекули з 20 залишками фруктози поміщеної у водне середовище. Результати розрахунків наведено на рис. 2.

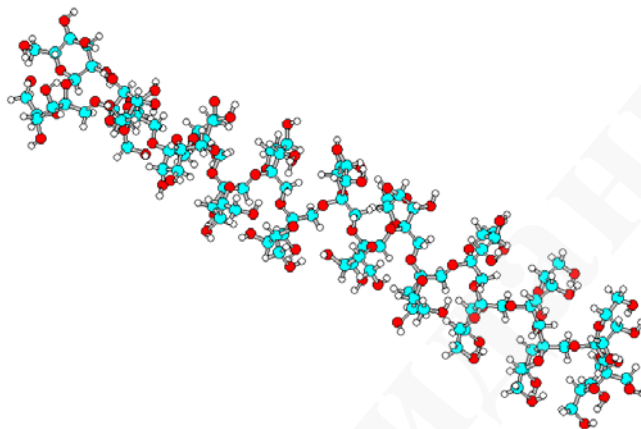


Рис. 2. Оптимізована геометрія молекули олігосахариду з 20 нарощеними залишками фруктози у розведеному водному розчині

Як видно з одержаних результатів на рис. 2, при переході молекули олігосахариду у водний розчин глобулярна структура поступово переходить у спіралеподібну. При цьому чим більш розведений розчин, тим менш стійкою стає глобулярна структура.

Стратегія квантово-хімічного моделювання в даній роботі полягала в поетапному наближенні системи від оптимізованих у вакуумі геометрій (оптимізована просторова будова) сахаридів (α -D-глюкопіраноза, α -D-фруктофураноза, β -D-фруктофураноза, сахароза та рафіноза) та амінооцтової кислоти, до оптимізованих у вакуумі геометрій систем. Отримані моделі одночасно містили молекули сахариду та амінокислоти й далі переносилися у водний розчин.

При оптимізації геометрії систем моносахарид-амінокислота основну увагу приділяли можливості утворення водневих зв'язків, їхній кількості й міцності в залежності від типу гідроксогрупи сахариду та орієнтації відносно неї молекули амінокислоти. Враховуючи той факт, що утворення водневих зв'язків першопочатково обумовлюється електростатичними взаємодіями, для оптимізації геометрії систем моносахарид-амінокислота був використаний метод молекулярної механіки, що базується на класичному ньютонівському методі обчислення енергії рівноважної геометрії та молекулярної динаміки об'єкта.

Враховуючи той факт, що для гідроксильних груп можливим є обертання навколо одинарного зв'язку C-O з утворення декількох конформацій, а це може впливати на розподіл ефективних зарядів на атомах у молекулі, оптимізацію геометрії проводили для різних вихідних конформацій вуглеводню. Як показали

проведені розрахунки, зміна конформації впливає на абсолютне значення ефективного заряду на конкретному атомі. Проте при цьому зберігається загальна тенденція розподілу зарядів по атомам молекули вуглеводу. Так, у випадку глюкози найбільші негативні заряди концентруються на атомах Оксигену безпосередньо зв'язаних з піранозним циклом, найменший заряд на Оксигені первинної гідроксогрупи. В той же час серед гідроксогруп піранозного циклу найвищі заряди переважають на Оксигені напівацетального гідроксилу та Оксигені з $CI=14$ (так звані 1- і 4-позиції). Результати наведено в табл. 1, 2 та на рис. 3, а, б. Це можливо є своєрідним підтвердженням того факту, що природні полісахариди на основі глюкози переважно зв'язуються через ці позиції.

Таблиця 1

Ефективні заряди на атомах Оксигену та Гідрогену
в молекулі α -D-глюкопіранози

CI	TA	Z_{ef}
1	O	-0.283069
13	O	-0.317338
14	O	-0.318335
15	O	-0.301993
16	O	-0.344134
18	O	-0.310291
20	H	0.210208
21	H	0.207827
22	H	0.201646
24	H	0.213335
23	H	0.197303

Примітка: CI – номер атому; TA – найменування атому; Z_{ef} – ефективний заряд

Таблиця 2

Ефективні заряди на атомах Оксигену та Гідрогену
в молекулі α -D-фруктофуранози

CI	TA	Z_{ef}
1	O	-0.295290
11	O	-0.294891
12	O	-0.304072
13	O	-0.303948
14	O	-0.302623
22	O	-0.303075
20	H	0.196434
21	H	0.200862
22	H	0.213179
24	H	0.189973
23	H	0.194059

Примітка: CI – номер атому; TA – найменування атому; Z_{ef} – ефективний заряд

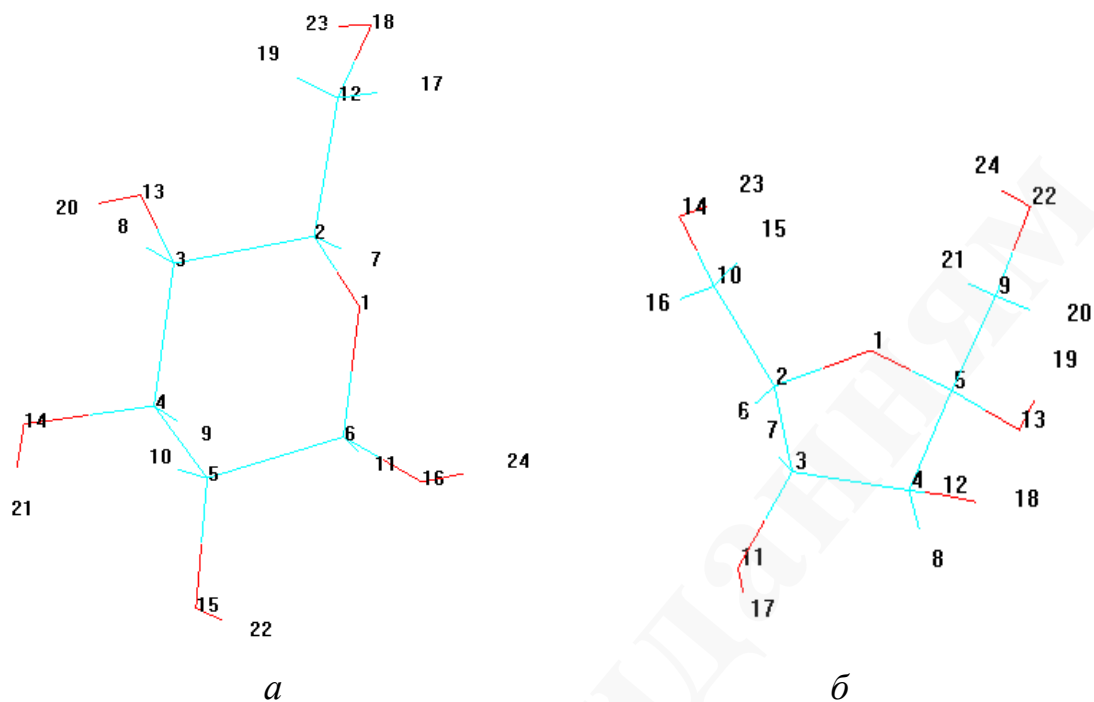


Рис. 3. Результати квантово-хімічної оптимізації геометрії молекули:
a – α -D-глюкопіраноза; *б* – α -D-фруктофураноза; цифри на рисунку – номери атомів, для яких розраховані ефективні заряди

Одержані дані дозволяють зробити припущення, що у випадку глюкози слід очікувати утворення водневих зв'язків переважно між цими атомами Оксигену і атомами Гідрогену протонованої аміногрупи кислоти. В той же час підвищений позитивний заряд на атомах Гідрогену вторинних гідроксильних груп дозволить їм утворювати водневі зв'язки з карбоксильною групою аміноцетової кислоти.

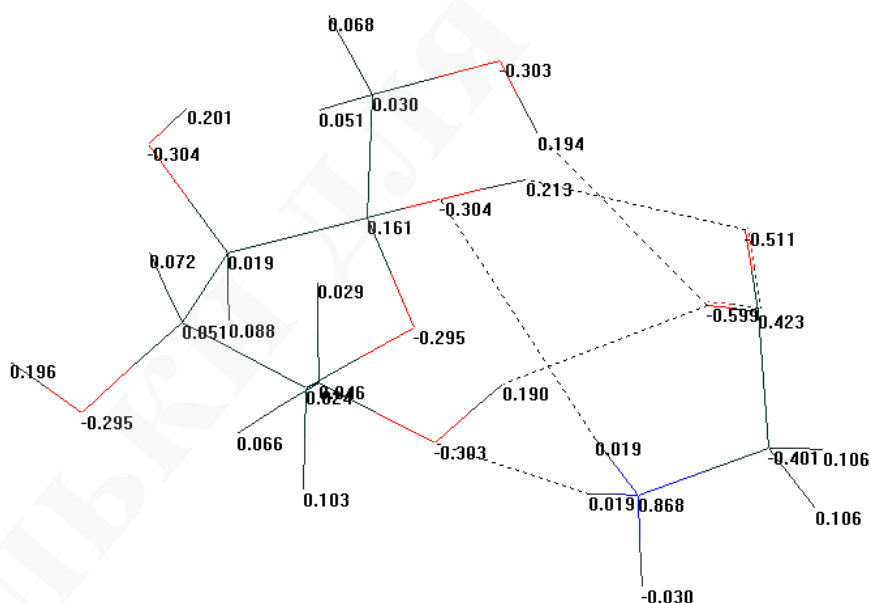
У випадку α -D-фруктофуранози та β -D-фруктофуранози ефективні заряди на атомах Оксигену гідроксигруп виявилися практично однаковими, в той час як Оксиген фуранозного циклу має найменший ефективний заряд. В той же час найбільший позитивний заряд на Гідрогені концентрується переважно на напівацетальному гідроксилі.

Для вирішення вище наведених питань був обраний підхід поетапного наближення, який полягав у наступному. Молекула амінокислоти у вигляді дипольного йону примусово орієнтувалася відповідною карбоксильною чи аміногрупою до кожної із спиртових груп відповідного вуглеводу. Геометрія одержаної системи оптимізувалася шляхом пошуку загального локального мінімуму енергій утворення водневого зв'язку за умови, що мінімальна довжина зв'язку не повинна перевищувати 2,3 Å. Для одержаної оптимізованої геометрії системи розраховувалися складові енергії водневого зв'язку – електростатична (Electrostatic) та донорно-акцепторна (H-bond). За одержаними величинами можна зробити висновок про внесок кожної складової у зв'язок, і відповідно, про загальну стійкість зв'язку. Так, у випадку глюкози, оптимізація геометрії системи підтвердила можливість утворення водневих зв'язків як через

карбонільну, так і аміногрупу кислоти (рис. 4). При цьому в ентальпію утворення водневого зв'язку як через карбоксильну групу, так і через аміногрупу електростатична та донорно-акцепторна, складові дають вклади одного порядку, хоча електростатичний внесок є трохи більшим.

При довільній орієнтації амінокислоти, або ж при орієнтації амінокислоти до молекули глюкози одночасно карбоксильною та аміногрупою, оптимізація геометрії системи показала, що більш вигідним є утворення декількох водневих зв'язків одночасно. При цьому майже на порядок зростає електростатичний внесок у енергію водневого зв'язку. Аналогічний результат спостерігається, якщо проводити оптимізацію геометрії системи, до складу якої входить одночасно молекула моносахариду та дві молекули амінокислоти.

При заміні глюкози на інші сахарида суттєво не змінює результати оптимізації геометрії – більш вигідним залишається утворення декількох водневих зв'язків і внесок електростатичної складової явно перевищує внесок донорно-акцепторної взаємодії. Останній висновок є суттєвим при переході від розрахунків хімічних систем у вакуумі до оптимізації геометрії хімічних систем у водних розчинах.



$$\text{H-bond} = -0.132845 \quad \text{Electrostatic} = -35.6097$$

Рис. 4. Результати оптимізації геометрії системи глюкоза-амінооцтова кислота методами молекулярної механіки для вихідної орієнтації амінокислоти до молекули фруктози через карбоксильну й аміногрупи одночасно

Оскільки водне середовище може виконувати одночасно дві функції хімічну (сольватуючу) та фізичну (диспергуючу, за рахунок ослаблення електростатичної взаємодії) необхідним є визначення впливу молекул води на стійкість багатоцентрових водневих зв'язків.

Логічним буде припущення, що водневі зв'язки, електростатичний внесок яких найбільший, у водному середовищі повинні ослаблюватися або навіть

повністю розриватися. В той час як групи з вищим внеском донорно-акцепторної складової мало відчуватимуть вплив середовища та будуть зберігатися і в розчинах.

Для підтвердження цього припущення були проведені розрахунки оптимізації геометрії системи сахарид-амінооцтова кислота у водних розчинах. Для цього асоціати моносахарид-амінооцтова кислота з оптимізованою у вакуумі геометрією поміщалися у періодичний бокс, заповнений молекулами води, і проводилася оптимізація геометрії умовного розчину. Для одержаної оптимізованої моделі додатково проводився розрахунок усіх можливих у системі водневих зв'язків.

Для врахування можливого впливу концентрації розчинених компонентів (іншими словами кількості молекул води в одиниці умовного водного розчину) на стійкість водневих зв'язків, розрахунок оптимізованих геометрій та водневих зв'язків у системі проводився для двох різних за об'ємом періодичних боксів. Об'єм першого містив не менше 50 молекул води в періодичному боксі, що характерно для концентрованих розчинів. Другий – не менше 600 молекул води (умовно розведений розчин). Обрахунки для кожної системи за однакових вихідних умов проводили не менше 5 раз. Результати вважалися за адекватні при співпадінні не менше 3 разів.

Деякі з одержаних результатів наведені на рис. 5. Для кращого візуального сприйняття на більшості рисунків видалені молекули води, які не приймають участь у сольватаційних процесах складових компонентів системи.

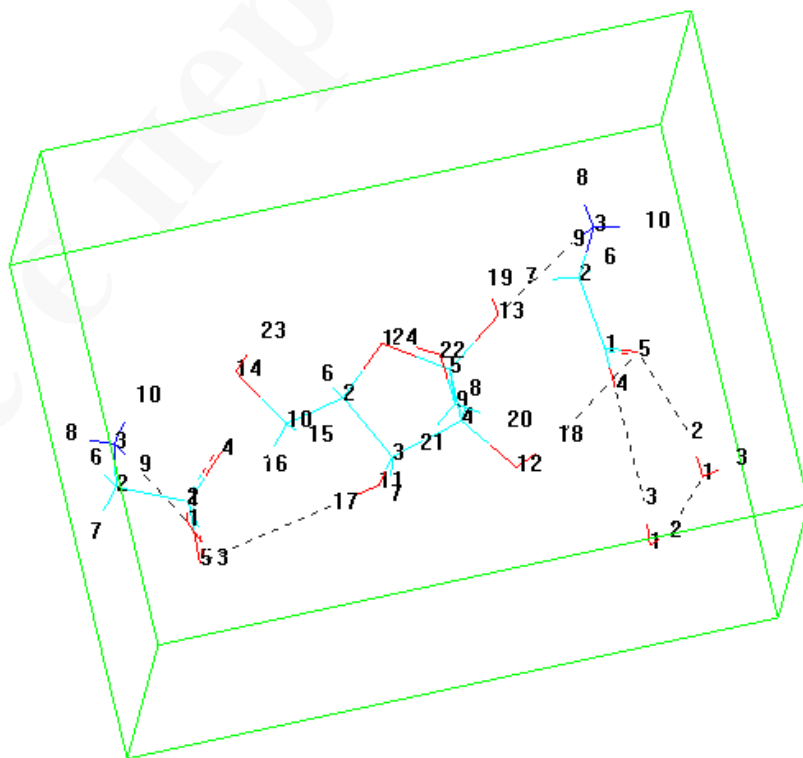


Рис. 5. Результати оптимізації геометрії системи α -D-фруктофураноза-амінооцтова кислота (співвідношення 1:2) у концентрованому водному розчині

Спиртові групи моносахариду при цьому також частково гідратовані. Цікавим є той факт, що відтворюваність гідратації спиртових груп за результатами розрахунків невисока. Це може свідчити про динамічний характер гідратації.

4. Висновки

Одержані результати свідчать про те, що у випадку сахаридів, особливо при зростанні кількості їх мономерних ланок, поступово нівелюється розподіл ефективних зарядів, в порівнянні з молекулами моносахаридів. Це повинно призводити до рівно ймовірного (статистичного) утворення асоціатів моносахарид-амінокислота за рахунок водневих зв'язків. Однак враховуючи той факт, що при зростанні кількості елементарних ланок моносахариду у молекулах можуть відбуватися процеси внутрішньомолекулярної самоорганізації (утворення спіралей, глобул, тощо), то доступним для утворення міжмолекулярних асоціатів буде лише частина гідроксогруп, не включена у самоорганізаційні процеси.

На основі одержаних результатів можна твердити, що:

- гідратація суттєво впливає на взаємодію між амінокислотою та моносахаридом;
- у водних розчинах переважно утворюється один водневий зв'язок між моносахаридом та амінокислотою;
- ймовірність утворення водневих зв'язків між функціональними групами амінокислоти та молекулами сахаридів практично однакова;
- у розведених розчинах взаємодія між амінокислотою та моносахаридом відбувається гірше, ніж у концентрованих;
- гідратація спиртових груп моносахариду носить динамічний характер.

Наслідком із наведених вище показників може бути той факт, що динамічний характер гідратації спиртових груп моносахариду буде приводити до появи вакантних несольватованих гідроксильних груп. Ці групи будуть своєрідними активними центрами для утворення Н-зв'язаних асоціатів між молекулами амінокислоти та моносахариду. В той же час ці центри матимуть блукаючий характер і з однаковою вірогідністю будуть утворювати водневі зв'язки із функціональними групами амінокислоти. Оскільки енергії сольватаційних зв'язків та Н-зв'язків амінокислота-моносахарид майже однакові, то утворення та руйнування асоціатів може продовжуватися достатньо довгий час, тим самим при дослідженні поляриметричних властивостей систем приводити до циклічного характеру їх зміни.

Література

1. Doronin, A. F., Ipatova, L. G., Kochetkova, A. A., Nechaev, A. P., Khurshudian, S. A., Shubina, O. G. (2009). *Funktsionalnye pischevye produkty. Vvedenie v tekhnologii*. Moscow: DeLi Print, 288.
2. Hager, C., Miethchen, R., Reinke, H. (2000). Epimerisation of Carbohydrates and Cyclitols, 17.1 Synthesis of Glycosyl Azides and N-Acetyl Glycosyl Amines of Rare Monosaccharides. *Synthesis*, 2000 (2), 226–232. doi: <http://doi.org/10.1055/s-2000-6250>

3. Wang, Q., Dordick, J. S., Linhardt, R. J. (2002). Synthesis and Application of Carbohydrate-Containing Polymers. *Chemistry of Materials*, 14 (8), 3232–3244. doi: <http://doi.org/10.1021/cm0200137>
4. Cherepanov, I. S., Trubachev, A. V., Abdullina, G. M. (2016). Amino-karbonilnye vzaimodeistviia uglevodov s zameschennymi aromatcheskimi aminami. *Khimicheskaja fizika i mezoskopiia*, 18 (2), 310–315.
5. Tomasik, P. (2004). *Chemical and functional properties of food saccharides*. New York: CRC Press LLC, 399.
6. Jing, H., Kitts, D. D. (2004). Antioxidant activity of sugar–lysine Maillard reaction products in cell free and cell culture systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 429 (2), 154–163. doi: <http://doi.org/10.1016/j.abb.2004.06.019>
7. Solozhenkin, P. M., Solozhenkin, O. I., Krausz, S. (2012). Prediction of Efficiency of Flotation Collectors Based on Quantum Chemical Computations. Books of Abstracts. *XXVI International Mineral Processing Congress-IMPC*. New Delhi, 2, 638.
8. Solozhenkin, P. M. (2012). Quantum-chemical and molecular-dynamic aspects of forecasting of properties of collectors of metals from productive solutions of nonferrous metals. *Week of the miner 2012. Separate release of the mountain information analytical bulletin (scientific and technical magazine)*. Publishing house «Mountain book», 1, 431–455.
9. Dunning, T. H. (1989). Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *The Journal of Chemical Physics*, 90 (2), 1007–1023. doi: <http://doi.org/10.1063/1.456153>
10. Becke, A. D. (1997). Density-functional thermochemistry. V. Systematic optimization of exchange-correlation functionals. *The Journal of Chemical Physics*, 107 (20), 8554–8560. doi: <http://doi.org/10.1063/1.475007>
11. Neese, F. (2008). *ORCA – an ab initio. Density Functional and Semiempirical program package. Version 2.9*. University of Bonn. Available at: http://rossi.chemistry.uconn.edu/chem5326/files/OrcaManual_2_9.pdf