

УДК 577.322

**ИК СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ И КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ
ПРОТОНИРОВАНИЯ ИЗОАЛЛОКСАЗИНОВОГО КОЛЬЦА ФЛАВИН-
МОНОНУКЛЕОТИДА****Ю. Н. Близнюк, Д. А. Песина, Д. М. Глибицкий, М. А. Семёнов, А. В. Шестопалова**
*Институт радиопластики и электроники им. А. Я. Усикова НАН Украины, ул. Ак. Проскуры, 12, Харьков, 61085, Украина*e-mail: julia-blyzniuk@yandex.ru

Поступила в редакцию 30 ноября 2015 года

Принята 11 декабря 2015 года

Флави́н-мо́нонуклеотид (FMN) является протетической группой многочисленных оксидоредуктаз, выполняющих окислительно-восстановительные функции в клетках. В реакции обратимого восстановления в коферменте задействовано изоаллоксазиновое кольцо, которое может при восстановлении принимать два электрона и два протона. Методом инфракрасной (ИК) спектроскопии в области поглощения C=C и C=N атомов изоаллоксазинового кольца ($1450\text{--}1650\text{ см}^{-1}$) получены спектры сухих пленок флави́н-мо́нонуклеоти́да, выращенных из нейтральных (pH=7,0) и слабых (pH=6,0) растворов. Обнаружены высокочастотные сдвиги полос поглощения внутрикольцевых колебаний в пленках, выращенных из слабых (pH=6,0) растворов. Эти высокочастотные сдвиги объяснены протонированием по атомам азота N₁ и N₅ изоаллоксазинового кольца. Проведенный в рамках теории функционала плотности (DFT) квантово-химический расчет показал, что на атомах N₁ и N₅ находятся значительные отрицательные заряды, которые связывают протоны. Полученные квантово-химические данные о зарядах на атомах изоаллоксазинового кольца и порядках его связей коррелируют с частотными сдвигами полос поглощения протонированных атомов внутрикольцевых колебаний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: инфракрасная спектроскопия, флави́н-мо́нонуклеоти́д, протонирование, квантово-химический расчет, атом азота.

**ІЧ СПЕКТРОСКОПІЧНИЙ ТА КВАНТОВО-ХІМІЧНИЙ ПРОЯВ ПРОТОНУВАННЯ
ІЗОАЛЛОКСАЗИНОВОГО КІЛЬЦЯ ФЛАВІН-МОНОНУКЛЕОТИДУ****Ю. М. Близнюк, Д. О. Песіна, Д. М. Глибицький, М. О. Семенов, Г. В. Шестопалова***Інститут радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України, вул. Ак. Проскури, 12, Харків, 61085, Україна*

Флави́н-мо́нонуклеоти́д (FMN) є протетичною групою численних оксидоредуктаз, що виконують окислювально-відновні функції в клітинах. В реакції оборотного відновлення в коферменті задіяне ізоаллоксазинове кільце, яке може при відновленні приймати два електрони і два протони. Методом інфрачервоної (ІЧ) спектроскопії в області поглинання C=C й C=N атомів ізоаллоксазинового кільця ($1450\text{--}1650\text{ см}^{-1}$) було отримано спектри сухих плівок флавін-мо́нонуклеоти́ду, вирощених з нейтральних (pH=7,0) і слабких (pH=6,0) розчинів. Виявлено високочастотні зсуви полос поглинання внутрішньокільцевих коливань у плівках, вирощених зі слабкого (pH=6,0) розчину. Ці високочастотні зсуви було пояснено протонуванням по атомах азоту N₁ і N₅ ізоаллоксазинового кільця. Проведений в рамках теорії функціонала щільності (DFT) квантово-хімічний розрахунок показав, що на атомах N₁ і N₅ знаходяться значні негативні заряди. Отримані квантово-хімічні дані про заряди на атомах ізоаллоксазинового кільця й порядки його зв'язків корелюють з частотними зсувами смуг поглинання протонуваних атомів внутрішньокільцевих коливань.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: інфрачервона спектроскопія, флавін-мо́нонуклеоти́д, протонування, квантово-хімічний розрахунок, атом азоту.

**IR SPECTROSCOPIC AND QUANTUM-CHEMICAL MANIFESTATION OF FLAVIN
MONONUCLEOTIDE'S ISOALLOXAZINE RING PROTONATION****Iu. N. Blyzniuk, D. A. Pesina, D. M. Glibitsky, M. A. Semenov, A. V. Shestopalova***O. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of NAS of Ukraine, 12 Akad. Proskury Str., Kharkiv, 61085, Ukraine*

Flavin mononucleotide (FMN) is the prosthetic group of many oxidoreductases performing redox function in cells. The coenzyme reversible reduction reaction involves isoalloxazine ring which may take

two electrons and two protons upon reduction. The spectra of dried films of flavin mononucleotide grown from neutral (pH=7,0) and weakly acidic (pH=6,0) solutions were obtained in absorption region of C=C, C=N atoms of isoalloxazine ring ($1450\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$) using infrared (IR) spectroscopic method. The high-frequency shifts of absorption bands of intra-ring vibrations in films grown from weakly acidic (pH=6,0) solution were found. These high-frequency shifts were explained by the protonation of N_1 and N_5 nitrogen atoms of the ring. The performed quantum-chemical calculation using the density functional theory (DFT) confirmed that the N_1 and N_5 atoms have significant negative charges. The obtained quantum-chemical data on the charges of the isoalloxazine ring atoms and its bond orders correlate with the frequency shifts of the absorption bands of protonated atoms of intra-ring vibrations.

KEYWORDS: infrared spectroscopy, flavin mononucleotide, protonation, quantum-chemical calculation, nitrogen atom.

Флавин-мононуклеотид (FMN) – аналог витамина B_2 – является простетической группой (коферментом) многочисленных оксидоредуктаз, выполняющих окислительно-восстановительные функции в клетках. Окисленная форма FMN представлена на рис. 1. В реакции обратимого восстановления в коферменте задействовано изоаллоксазиновое кольцо. Полагают, что при этом атомы водорода (протоны) присоединяются к двум атомам азота N_1 и N_5 кольца. При восстановлении происходит передача двух атомов водорода (двух протонов и двух электронов). Ранее сведения о протонировании по атомам N_1 и N_5 в кислых растворах получены при исследовании спектров FMN в области поглощения изоаллоксазинового кольца (230–500 нм) [1].

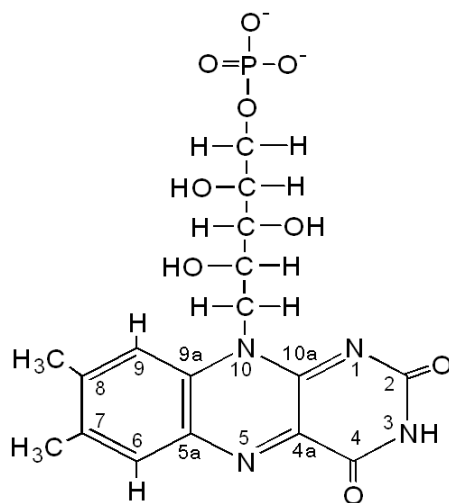


Рис. 1. Структурная формула окисленной формы флавин-мононуклеотида (FMN).

Прямые сведения о присоединении протонов к атомам N_1 и N_5 может дать инфракрасная (ИК) спектроскопия, поскольку в настоящее время выполнена достаточно надежная интерпретация полос поглощения внутрикольцевых колебаний с участием атомов азота N_1 и N_5 изоаллоксазинового кольца ИК спектров FMN [2, 3]. Дополнительные сведения о влиянии протонирования на внутрикольцевые колебания можно получить с помощью квантово-химических расчетов [4, 5].

В работе [4] исследование флавин-мононуклеотида, проведенное с помощью ИК спектроскопии многофотонной диссоциации (IRMPD) и DFT расчетов, показало, что FMN наиболее стабилен в виде O_2 - и N_1 -протонированного таутомера. Изучение физико-химических свойств люмифлавина (модельного соединения для рибофлавина) в растворах методом разрешенной по времени ИК спектроскопии (TRIR) и квантово-химическими расчетами (теории функционала плотности, DFT) показали, что

термодинамически выгодное положение для присоединения протона – это атом азота N₅ кольцевой системы флавина [5].

Целью работы было провести сравнительный анализ полос поглощения в области 1450-1600 см⁻¹, связанных с внутрикольцевыми колебаниями атомов С-С, С-N₁ и С-N₅ изоаллоксазинового кольца, в нейтральной и протонированной формах FMN. Поскольку в растворах на полосы поглощения FMN существенное влияние оказывает растворитель (H₂O), ИК спектры были получены для высушенных пленок FMN, выращенных из нейтральных (рН=7,0) и слабокислых (рН=6,0) водных растворов. С помощью квантово-химических расчетов были получены оптимизированные структуры нейтральной и протонированной форм FMN, анализ которых позволил установить влияние протонирования на распределение электронной плотности и изменение порядка связей внутрикольцевых колебаний изоаллоксазинового кольца.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали флавин-мононуклеотид (7,8-диметилизо-аллоксазин • Na, рис. 1) фирмы «Fluka» без дополнительной очистки. Методика приготовления растворов FMN для ИК-спектроскопических исследований описана ранее [6].

ИК спектроскопия

ИК спектры записывали для пленок, выращенных из растворов FMN с рН=7,0 и рН=6,0. Обезвоженные до 0% относительной влажности (ОВ) пленки FMN были получены с помощью сушки вакуумом. Запись ИК-спектров FMN проводилась с помощью автоматического двухлучевого спектрофотометра UR-20 (Германия) с призмой NaCl. Техника обезвоживания, получения и обработки ИК спектров пленок FMN детально описана в работе [6].

Разложение ИК спектров

Для уточнения частот полос поглощения внутрикольцевых валентных С-С и С-N колебаний изоаллоксазинового кольца FMN проводили разложение ИК спектра по стандартной методике [7]. В качестве формы спектральных линий использовался псевдо-Фогтовский профиль (линейная комбинация профилей Гаусса и Лоренца). Оптимизацию параметров полос выполняли методом деформируемого многогранника [8].

Квантово-химическое моделирование

Для всех квантово-химических вычислений использовали программу Orca 2.9 [9]. Расчеты проводились в рамках теории функционала плотности (DFT) с применением функционала B3LYP [10, 11] в базисном наборе def2-SVP [12], используя также дополнительный базисный набор def2-SVP/J [13]. Для уменьшения времени вычислений использовали опцию RIJCOSX. Использование этих базисных наборов def2-SVP и опции RIJCOSX в сочетании с B3LYP позволяет соблюсти баланс точности расчетов и вычислительной эффективности. Соответствие найденных оптимизированных структур минимумам поверхностей потенциальных энергий подтверждено расчетами вторых производных энергии по координатам и отсутствием мнимых частот в расчетных колебательных спектрах. Заряды на атомах, воспроизводящие электростатический потенциал молекулы, были рассчитаны с использованием схемы Chelpg [14], а порядки связей – по Майеру [15].

Координаты атомов FMN были взяты из экспериментально определенной пространственной структуры молекулы (id 1fvp [16]), представленной в базе данных Protein Data Bank [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ИК спектроскопическое проявление протонирования изоаллоксазинового кольца FMN

На рис. 2 представлен ИК спектр в области поглощения $1450-1600\text{ см}^{-1}$ сухой пленки FMN, выращенной из нейтрального ($\text{pH}=7,0$) раствора. Видно, что эта спектральная область состоит из трех не сильно перекрывающихся полос поглощения. С учетом разложения мы выделили самую сильную полосу при $\nu_1=1541\text{ см}^{-1}$ ($\pm 2\text{ см}^{-1}$), низкочастотную компоненту с максимумом при $\nu_2=1501\text{ см}^{-1}$ ($\pm 2\text{ см}^{-1}$) и высокочастотную полосу с максимумом при $\nu_3=1575\text{ см}^{-1}$ ($\pm 2\text{ см}^{-1}$).

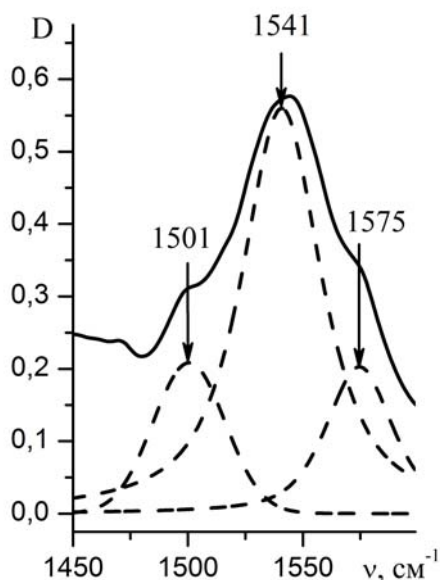


Рис. 2. ИК спектр поглощения внутрикольцевых С-С и С-Н колебаний изоаллоксазинового кольца FMN: (—) экспериментально полученный спектр и (---) спектр, полученный методом разложения. Пленка FMN выращена из раствора с $\text{pH}=7,0$.

Согласно данным работ [2, 3] эти полосы связаны с валентными колебаниями атомов С-С и С-Н в изоаллоксазиновом кольце FMN. В таблице 1 приведены полосы и их отнесение, сделанное в работе [3].

Как видно из таблицы 1, частоты полос поглощения ν_1 и ν_2 могут быть чувствительны «в чистом виде» к протонированию по атомам азота N_1 и N_5 . В полосу ν_3 дают вклад оба атома азота N_1 и N_5 .

Таблица 1

ИК полосы поглощения внутрикольцевых колебаний изоаллоксазинового кольца FMN и их отнесение

Частота (ν), см^{-1}	Отнесение
1501 (± 2) (ν_2)	Полоса IV, $\nu(\text{C}_6=\text{C}_7)$; $\nu(\text{C}_9-\text{C}_{9a})$; $\nu(\text{C}_{10a}=\text{N}_1)$
1541 (± 2) (ν_1)	Полоса III, $\nu(\text{C}_{5a}=\text{C}_6)$; $\nu(\text{C}_8-\text{C}_9)$; $\nu(\text{C}_{5a}=\text{N}_5)$
1575 (± 2) (ν_3)	Полоса II, $\nu(\text{C}_{4a}=\text{N}_5)$; $\nu(\text{C}_4-\text{C}_{4a})$; $\nu(\text{C}_{10a}=\text{N}_1)$

Для выяснения влияния протонирования на полосы поглощения ν_1 , ν_2 и ν_3 нами получен спектр сухой пленки FMN, выращенной из слабокислого (pH=6,0) водного раствора. Предполагается, что в этих условиях происходит протонирование изоаллоксазинового кольца по атомам N_1 и N_5 [1]. На рис. 3 представлен ИК спектр пленки FMN (pH=6,0) в области поглощения внутрикольцевых валентных колебаний и его компоненты, полученные разложением экспериментального спектра. Видны существенные сдвиги рассматриваемых полос поглощения, по сравнению с таким же спектром для пленки, выращенной из нейтрального раствора (см. рис. 2 и данные таблицы 2).

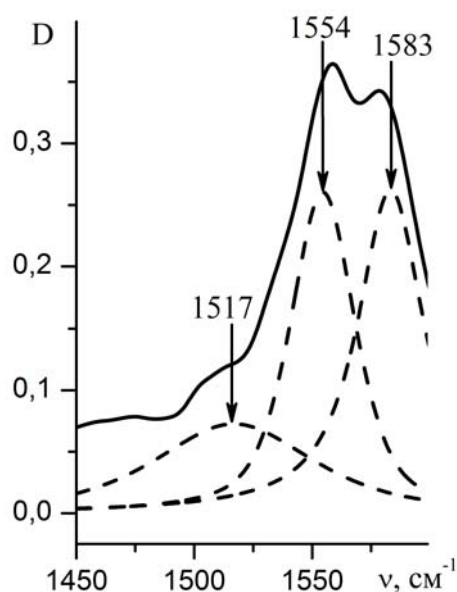


Рис. 3. ИК спектр поглощения внутрикольцевых С-С и С-N колебаний изоаллоксазинового кольца FMN: (—) экспериментально полученный спектр и (---) спектр, полученный методом разложения. Пленка FMN выращена из раствора с pH=6,0.

Таблица 2

Частоты и частотные сдвиги полос поглощения для пленок FMN, выращенных из нейтрального и слабокислого растворов

Полоса	Максимум полосы поглощения пленки FMN (pH=7,0), cm^{-1}	Максимум полосы поглощения пленки FMN (pH=6,0), cm^{-1}	Частотный сдвиг $\Delta\nu$, cm^{-1}
ν_1	1541 (± 2)	1555 (± 2)	+14 (± 2)
ν_2	1501 (± 2)	1517 (± 2)	+16 (± 2)
ν_3	1575 (± 2)	1583 (± 2)	+8 (± 2)

Из результатов, представленных в таблице 2 видно, что протонирование изоаллоксазинового кольца по атомам N_1 и N_5 вызывает значительное увеличение частот колебаний ν_1 и ν_2 и в меньшей степени – для полосы ν_3 . Для объяснения высокочастотных сдвигов нами был выполнен квантово-химический расчет электронной плотности (зарядов) на атомах и порядка связей изоаллоксазинового кольца.

Квантово-химический расчет зарядов на атомах и порядка связей изоаллоксазинового кольца FMN

В таблице 3 представлены заряды на атомах для нейтрального и протонированного по атомам N_1 и N_5 колец FMN и разница зарядов $\text{FMN } N_1H^+N_5H^+ - \text{FMN } N_1N_5$.

Из этих данных видно, что на атомах азотов N_1 и N_5 находятся значительные отрицательные заряды $-0,612$ и $-0,545$, соответственно. Поэтому связывание положительно заряженного атома водорода (протона), вероятно, будет идти по этим атомам.

Из таблицы 3 также можно видеть, что протонирование атомов N_1 и N_5 сопровождается перераспределением электронной плотности (зарядов): (i) на атомах C_{5a} , C_6 , C_8 и C_9 совместно с атомом N_5 (см. табл. 1), которые определяют частоту полосы III (ν_1); (ii) на атомах C_6 , C_7 , C_9 , C_{9a} и C_{10a} и N_1 , определяющих частоту полосы IV (ν_2); (iii) на атомах C_{4a} , N_5 , C_4 , C_{10a} и N_1 , определяющих частоту полосы II (ν_3).

Таблица 3

Заряды на атомах протонированного и непротонированного изоаллоксазинового кольца FMN и их разница (все заряды приведены в атомных единицах, а.у.)

Нумерация атомов	FMN $N_1H^+N_5H^+$	FMN N_1N_5	FMN $N_1H^+N_5H^+$ – FMN N_1N_5
N_1	-0,447	-0,612	0,165
C_2	0,725	0,927	-0,202
O	-0,405	-0,623	0,218
N_3	-0,575	-0,756	0,181
C_4	0,643	0,742	-0,099
O	-0,420	-0,581	0,161
C_{4a}	-0,054	0,236	-0,290
N_5	-0,122	-0,545	0,423
C_{5a}	0,258	0,570	-0,311
C_6	-0,379	-0,473	0,094
C_7	0,259	0,203	0,056
C	-0,421	-0,416	-0,005
C_8	0,237	0,185	0,053
C	-0,434	-0,468	0,034
C_9	-0,272	-0,289	0,017
C_{9a}	0,035	-0,283	0,318
N_{10}	0,153	0,349	-0,196
C_{10a}	0,307	0,179	0,128
C(R)	-0,416	-0,528	0,112

В работе также рассчитаны порядки связей атомов в протонированном и непротонированном изоаллоксазиновом кольце FMN и их разница. Результаты расчетов представлены в таблице 4.

Из результатов, представленных в таблице 4, следует, что для полосы III (ν_1) (табл. 1) порядок связей $C_{5a}-C_6$, C_8-C_9 и $C_{5a}-N_5$ незначительно уменьшился (от 0,022 до 0,095); для полосы IV (ν_2) порядок связей C_6-C_7 , C_9-C_{9a} незначительно увеличивается (на 0,049), а для $C_{10a}-N_1$ в то же время уменьшается (на 0,256); для полосы II (ν_3) порядок связи C_4-C_{4a} практически не изменился, тогда как порядок связей $C_{4a}-N_5$ и $C_{10a}-N_1$ уменьшается на 0,265 и 0,256, соответственно.

Таблица 4

Порядки связей протонированного и непротонированного изоаллоксазинового кольца FMN и их разница

Связи	FMN N ₁ H ⁺ N ₅ H ⁺	FMN N ₁ N ₅	FMN N ₁ H ⁺ N ₅ H ⁺ – FMN N ₁ N ₅
N ₁ -C ₂	0,9762	1,1138	-0,1376
N ₁ -C _{10a}	1,3301	1,5857	-0,2556
N ₁ -H	0,7721		-
C ₂ -O	2,2159	2,1143	0,1016
C ₂ -N ₃	1,0538	1,0307	0,0231
N ₃ -C ₄	1,1522	1,1293	0,0229
N ₃ -H	0,8759	0,8921	-0,162
C ₄ -O	2,1831	2,2582	-0,0751
C ₄ -C _{4a}	0,8850	0,8828	0,0022
C _{4a} -N ₅	1,4361	1,7284	-0,2653
C _{4a} -C _{10a}	1,1588	1,0737	0,0851
N ₅ -C _{5a}	1,2734	1,3684	-0,095
N ₅ -H	0,8422		-
C _{5a} -C ₆	1,2325	1,2560	-0,0235
C _{5a} -C _{9a}	1,1772	1,2714	-0,0942
C ₆ -C ₇	1,4499	1,4007	0,0492
C ₆ -H	0,9953	1,0022	-0,0069
C ₇ -C ₈	1,1800	1,2868	-0,1068
C ₈ -C ₉	1,3610	1,3827	-0,0217
C ₉ -C _{9a}	1,3307	1,2826	0,0481
C _{9a} -N ₁₀	1,1259	1,1170	0,0089
N ₁₀ -C _{10a}	1,2681	1,1968	0,0713
N ₁₀ -C	0,8998	0,9436	-0,0438

Полученные данные о порядках связей коррелируют с частотными сдвигами полос поглощения ν_1 , ν_2 и ν_3 (см. табл. 3): чем меньше изменяется порядок связей, тем больше частотный сдвиг в протонированном изоаллоксазиновом кольце.

ВЫВОДЫ

Анализ полученных ИК спектров в области поглощения внутримолекулярных валентных C-C и C-N колебаний изоаллоксазинового кольца FMN в высушенной пленке (0% ОВ), выращенной из слабокислого раствора, показал, что протонирование кольца может происходить по атомам азота N₁ и N₅. Квантово-химические расчеты зарядов на атомах изоаллоксазинового кольца подтвердили этот вывод, поскольку на атомах N₁ и N₅ находятся значительные отрицательные заряды.

Обнаруженные высокочастотные сдвиги полос поглощения внутримолекулярных колебаний связаны с увеличением силовой постоянной (k): частота колебаний пропорциональна k . В величину k , согласно теории колебаний многоатомных молекул, в том числе гетероциклических [18], вносят вклад изменения зарядов и порядков связей, что и было определено при проведении квантово-химических расчетов протонированной формы изоаллоксазинового кольца FMN. Но связь между силовыми

постоянными k колеблющихся атомов и изменением зарядов и порядков связей требует специального теоретического рассмотрения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beiner H. Spectral characteristics of flavins at the semiquinoid oxidation Level / H. Beiner // *J. Am. Chem. Soc.* – 1956. – Vol. 78, № 20. – P. 5323–5328.
2. Thöing C. Protonated triplet-excited flavin resolved by step-scan FTIR spectroscopy: implications for photosensory LOV domains / C. Thöing, A. Pfeifer, S. Kakorin, T. Kottke // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2013. – Vol. 15. – P. 5916–5926.
3. Ataka K. Vibrational spectroscopy of an algal phot-LOV1 domain probes the molecular changes associated with blue-light reception / K. Ataka, P. Hegemann, J. Heberle // *Biophys. J.* – 2003. – Vol. 84, № 1. – P. 466–74.
4. Probing protonation sites of isolated flavins using IR spectroscopy: from lumichrome to the cofactor flavin mononucleotide / J. Langer, A. Günther, S. Seidenbecher [et al.] // *Chemphyschem.* – 2014. – Vol. 15, № 12. – P. 2550–2562.
5. Martin C. B. The reaction of triplet flavin with indole. A study of the cascade of reactive intermediates using density functional theory and time resolved infrared spectroscopy / C. B. Martin, M.-L. Tsao, C. M. Hadad, M. S. Platz // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – Vol. 124, № 24. – P. 7226–34.
6. Самоассоциация и гидратация флавин-монопнуклеотида в растворах и плёнках / Ю. Н. Близинок, Д. М. Глибицкий, М. А. Семёнов [и др.] // *Біофізичний Вісник.* – 2014. – Т. 31, № 1. – С. 5–22. / Samoassociaciya i gidrataciya flavin-mononukleotida v rastvorah i plenkah / Ju. N. Blyzniuk, D. M. Glibitsky, M. A. Semenov [i dr.] // *Biofiz. Visn.* – 2014. – Т. 31, № 1. – С. 5–22./
7. Химмельблау Д. М. Прикладное нелинейное программирование / Д. М. Химмельблау. – М: Мир, 1975. – 536 с./ Himmel'blau D. M. Prikladnoe nelinejnoe programmirovanie / D. M. Himmel'blau // М: Мир, 1975. – 536 с./
8. Nelder J.A. A simplex method for function minimization / J. A. Nelder, R. Mead // *The Computer Journal.* – 1965. – Vol. 7, № 4. – P. 308–313.
9. Frank N. The ORCA program system / N. Frank // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science.* – 2012. – Vol. 2, № 1. – P. 73–78.
10. Becke A.D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior / A. D. Becke // *Phys. Rev. A.* – 1988. – Vol. 38, № 6. – P. 3098–3100.
11. Chengteh L. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density / L. Chengteh, Y. Weitao, G. P. Robert // *Phys. Rev. B.* – 1988. – Vol. 37, № 2. – P. 785–789.
12. Schaefer A. Fully optimized contracted Gaussian-basis sets for atoms Li to Kr / A. Schaefer, H. Horn, R. J. Ahlrichs // *Chem. Phys.* – 1992. – Vol. 97. – P. 2571–2577.
13. Weigend F. Accurate Coulomb-fitting basis sets for H to Rn / F. Weigend // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2006. – Vol. 8. – P. 1057–1065.
14. Breneman C. M. Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis / C. M. Breneman, K. B. Wiberg // *Journal of Computational Chemistry.* – 1990. – Vol. 11, № 3. – P. 361–373.
15. Mayer I. On the chemical hamiltonian apparatus, bond orders and valences / I. Mayer // In "Modelling of structure and properties of molecules" Z. B. Maksic (ed.). – Ellis Horwood, Chicester. – 1987 – P. 145–159.
16. Kita A. Structure of flavoprotein FP390 from a luminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* refined at 2.7 Å resolution / A. Kita, S. Kasai, M. Miyata, K. Miki // *Acta Crystallogr. Sect. D.* – 1996. – V. 52. – P. 77–86.
17. The Protein Data Bank / H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – Vol. 28. – P. 235–242.
18. Колебания молекул / М. В. Волькенштейн, М. А. Ельяшевич, Б. И. Степанов, Л. А. Грибов. – М. : Наука, 1972. – 699 с. /Kolebanija molekul / M. V. Vol'kenshtejn, M. A. El'jashevich, B. I. Stepanov, L. A. Gribov. – М. : Nauka, 1972. – 699 с./