

University of Groningen

Just add sugar...

Pijning, Tjaard

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2014

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Pijning, T. (2014). *Just add sugar... Structural Studies on Glucansucrase and Fructansucrase Enzymes from Lactobacilli*. Groningen: s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.



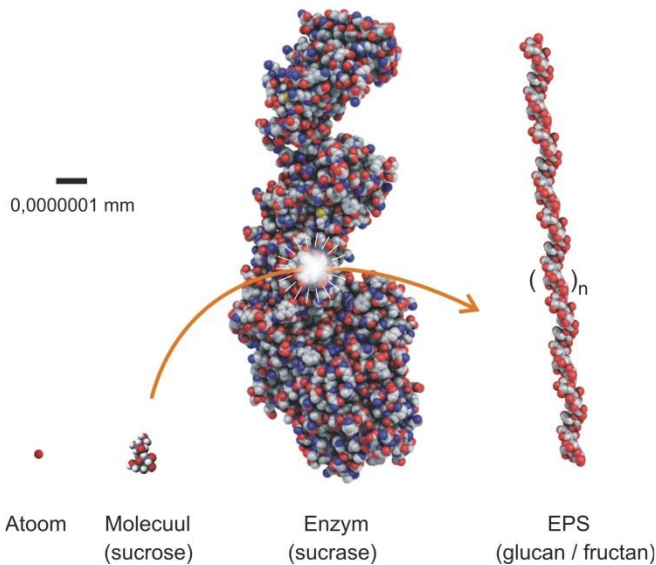
Samenvatting

Dit hoofdstuk geeft een korte algemene inleiding op het onderzoek beschreven in dit proefschrift, en beschrijft kort de belangrijkste resultaten.

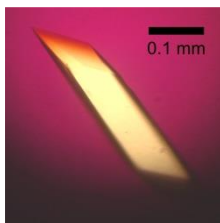
Hoe divers het leven op aarde ook is, alle levende organismen hebben één ding gemeen: ze zijn opgebouwd uit atomen en groepen bij elkaar horende atomen (moleculen). Deze atomen en moleculen gaan voortdurend chemische reacties met elkaar aan, waarbij nieuwe moleculen worden gevormd, omgezet en weer afgebroken. Bijvoorbeeld om energie te genereren - onontbeerlijk voor elk levend wezen. Of om zichzelf te beschermen tegen vijandige organismen of omgevingen, of om nieuwe omgevingen te 'veroveren'. Elke wetenschapper is geïnteresseerd in 'hoe iets werkt', en elke levenswetenschapper bestudeert dus de processen die levende organismen (zoals mensen, dieren, planten, bacteriën) gebruiken om te kunnen leven.

Bij veel van de processen in levende cellen spelen eiwitten een cruciale rol. Ze zijn zo belangrijk omdat de reacties tussen atomen en moleculen meestal niet vanzelf plaatsvinden; extra hulp wordt dan geboden door een speciale groep eiwitten, enzymen genaamd. Elk enzym is in staat om één bepaalde reactie te versnellen; dit wordt katalyse genoemd. Zo zijn er enzymen die voedsel afbreken en daar energie uit halen; enzymen die gifstoffen onschadelijk maken, signalen in de hersenen doorgeven, of bij celdeling het DNA kopiëren. Enzymen zou je dus kunnen beschouwen als kleine machines, die het leven in gang houden. Geen wonder dus dat levenswetenschappers geïnteresseerd zijn in de werking van deze enzymen.

Als je wilt weten hoe ze werken, dan zul je allereerst willen weten hoe enzymen er uit zien, hoe ze zijn opgebouwd. Want ook enzymen bestaan, net als de moleculen die door ze worden omgezet, uit atomen. Meestal bestaat een enzym uit een groep van een paar duizend atomen, bij elkaar gehouden door atoombindingen (zie Figuur 1). Dan nog zijn ze zó klein, dat we ze zelfs met de beste microscoop nog niet kunnen zien: de meeste enzymen zijn slechts een paar miljoenste millimeter in doorsnee! Daarom gebruiken we een speciale techniek die gebruik maakt van krachtig Röntgenlicht in plaats van gewoon licht. Bovendien worden de enzymen niet afzonderlijk bekeken - het signaal zou dan nog veel te zwak zijn - maar eerst worden ze gekristalliseerd. In een enzymkristal zitten heel veel enzymmoleculen keurig netjes in rijen en lagen op elkaar gestapeld. Het 'beschieten' van al die enzymmoleculen in de kristallen met Röntgenlicht zorgt voor verstrooiing van dat licht - we noemen dat Röntgendiffractie. Uit het diffractiepatroon van een kristal kunnen we vervolgens met veel rekenwerk een driedimensionaal model maken van het enzym: we zien hoe alle atomen in het enzym aan elkaar zitten, de '3D structuur'. En we kunnen gaan bedenken hoe het enzym zou kunnen werken. Dat is wat eiwitkristallografen doen.



Figuur 1. Atomen vormen moleculen; moleculen worden door enzymen omgevormd tot andere moleculen. Sucrase enzymen zetten het sucrose moleculen om in EPS-ketens; dit zijn zeer lange moleculen waarin stukjes van het startmateriaal aan elkaar gekoppeld zijn. Het symbool $()_n$ geeft aan dat EPS moleculen vele honderdduizenden bouwstenen in één keten kunnen hebben. De EPS moleculen kunnen lineair zijn, zoals in deze figuur, of vertakt.



Figuur 2. Eiwitkristal.

Het maken van een kristal van een enzym of ander eiwit is echter niet eenvoudig. Eerst moet het enzym in zeer zuivere vorm worden verkregen (bijvoorbeeld uit de bacterie waar het uit komt). Vervolgens worden kleine druppeltjes enzym gemengd met andere chemische stoffen; door heel veel (soms duizenden) verschillende combinaties te proberen hopen we de juiste omstandigheden te vinden waarbij een mooi kristal ontstaat. Dat is vaak een proces van dagen of weken...

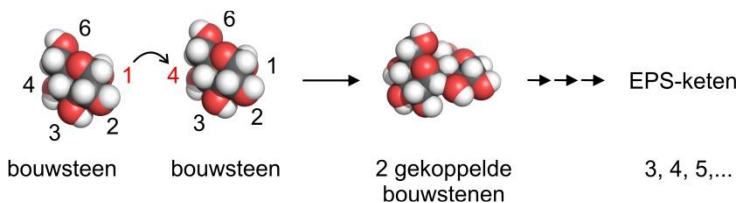
Een andere manier om een beeld te krijgen van de 3D structuur van enzymen en eiwitten maakt ook gebruik van Röntgenlicht, maar dan zonder dat er kristallen nodig zijn. Het beeld is dan echter een stuk minder nauwkeurig; we zien alleen de globale vorm. Voordeel van deze techniek (Small Angle X-ray Scattering ofwel SAXS genoemd) is wel dat je ook kunt bestuderen of de enzymen verschillende vormen aannemen (flexibiliteit).

In dit proefschrift richten we ons op een groep enzymen uit melkzuurbacteriën, gebruik makend van zowel Röntgendiffractie als SAXS. Van oudsher worden melkzuurbacteriën al gebruikt bij het bereiden van allerlei voedingsproducten, bijvoorbeeld yoghurt en kaas. Melkzuurbacteriën komen echter ook voor in de menselijke darmflora; ons darmstelsel wordt 'bewoond' door biljoenen micro-organismen, en de laatste jaren is er veel bekend geworden over hun rol met betrekking tot onze gezondheid. Zo blijken er 'goede' en 'slechte' bacteriën voor te komen; melkzuurbacteriën (*Lactobacillus*) en *Bifidobacterium* behoren bij de eerste categorie. Nu blijken deze bacteriën bepaalde

moleculen te maken waarvoor de laatste jaren veel belangstelling is. Het gaat om een bepaald type koolhydraten met interessante eigenschappen die we prebiotisch noemen: ze hebben een gunstig effect op de menselijke gezondheid. De 'goede' bacteriën die deze koolhydraten maken noemen we probiotisch. Probiotische bacteriën blijken de weerstand te versterken, het cholesterolgehalte te kunnen verlagen en bepaalde types kanker te helpen voorkomen. Het innemen van prebiotische koolhydraten bevordert de groei van goede bacteriën, en hebben op die manier dus vergelijkbare effecten.

Uit het oogpunt van voeding en gezondheid gezien is het natuurlijk erg interessant om prebiotische koolhydraten te bestuderen, en dus willen we graag weten hoe ze gemaakt worden. Het blijkt dat deze koolhydraten bestaan uit lange ketens, opgebouwd uit tot wel honderdduizenden aaneengeschakelde bouwstenen. De lange koolhydraatketens vormen een slijmerige, plakkerige laag aan de buitenkant van de bacteriecellen. We noemen ze dan ook EPS: extracellulaire polysacchariden. Waarschijnlijk speelt het EPS een rol bij het vormen van zogenaamde biofilms: lagen bacteriën die zich aan een oppervlak vasthechten en op die manier beter gedijen. Voor de bacterie een manier om te overleven, maar het kan echter ook nadelig zijn: in de mondholte vormen bacteriën in zo'n biofilm de mogelijkheid voor zuur-producerende bacteriën om zich vast te hechten op tanden en kiezen (tandplak). De zuren lossen het tandglazuur op, wat uiteindelijk tot tandbederf (caries) kan leiden.

In melkzuurbacteriën wordt de EPS-laag gemaakt door speciale enzymen, de sucrases. Zij koppelen de bouwstenen waaruit EPS bestaan aan elkaar tot lange ketens. Dit kan op veel verschillende manieren, doordat elke bouwsteen op verschillende manieren aan de volgende bouwsteen geschakeld kan worden (Figuur 3).



Figuur 3. De koppeling tussen bouwstenen (in dit voorbeeld: glucose) in een EPS-keten. Elke bouwsteen heeft 5 posities (1, 2, 3, 4 en 6) waar een koppeling gemaakt kan worden. In dit voorbeeld koppelen twee bouwstenen via posities 1 en 4; dit noemen we een $\alpha(1\rightarrow4)$ koppeling. Door steeds een extra bouwsteen te koppelen ($\rightarrow\rightarrow\rightarrow$) ontstaat uiteindelijk een lange EPS-keten.

Zo zijn er α (alpha)- en β (beta)-type schakels, en een verdere onderverdeling m.b.v. nummers (1 \rightarrow 2, 1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4, 1 \rightarrow 6, 2 \rightarrow 1 en 2 \rightarrow 6). Al die verschillende mogelijkheden om de ketens te schakelen leiden tot een enorme verscheidenheid in keten-eigenschappen. Grofweg onderscheiden we twee soorten EPS: glucanen en fructanen. Er zijn dan ook

.....

twee soorten sucrases: glucansucrases en fructansucrases. Elk glucan- of fructansucrase enzym maakt één specifieke soort keten. Tot een jaar of tien geleden was er maar weinig bekend over de werking van glucan- en fructansucrases, laat staan over de precieze 3D structuur van deze moleculaire 'fabriekjes'. In samenwerking met een onderzoeksgroep die melkzuurbacterie-sucrases identificeerde en karakteriseerde, richtten we ons als eiwitkristallografen vooral op het kristalliseren van de enzymen, en het bepalen van hun 3D structuur. Met de resultaten beschreven in dit proefschrift kunnen we nu meer zeggen over het hoe en waarom van hun werking. Het leverde belangrijke informatie op over hoe we deze enzymen zouden kunnen gebruiken om zelf koolhydraten te maken met gewenste eigenschappen. Bijvoorbeeld m.b.t. koolhydraten als voedings-ingrediënten met een gunstig effect op de gezondheid van het darmstelsel. Of gemodificeerde koolhydraten als toevoeging aan tandpasta die heel specifiek de bacteriële sucrose-enzymen remmen die betrokken zijn bij de vorming van tandplak.

Na het inleidend hoofdstuk (**Hoofdstuk 1**) beschrijft het eerste experimentele hoofdstuk in dit proefschrift, **Hoofdstuk 2**, hoe het lukte om kristallen te maken van een glucansucrase, GTF180- Δ N uit de melkzuurbacterie *Lactobacillus reuteri* 180. Dit enzym synthetiseert, uitgaande van sucrose, een glucaan-type EPS waarbij de bouwstenen (glucose) d.m.v. schakels van het type $\alpha(1\rightarrow6)$ en $\alpha(1\rightarrow3)$ aan elkaar zitten. De drie verschillende soorten kristallen van GTF180- Δ N die konden worden gemaakt, bleken alle drie geschikt te zijn voor het doen van Röntgendiffractie experimenten. Dat was nog niet eerder gerapporteerd in de literatuur. Eigenlijk werd een deel van het enzym gekristalliseerd, maar we konden aantonen dat dit niet uitmaakte voor de werking: ook het deel-enzym was heel goed in staat om hetzelfde product te maken uit sucrose.

Met één van de drie kristaltypes beschreven in Hoofdstuk 2 lukte het een tijdje later de 3D structuur van GTF180- Δ N te bepalen door middel van de Röntgendiffractie techniek - de eerste gepubliceerde glucansucrase structuur ooit. Het enzym bleek een langgerekte vorm te hebben, bestaande uit vijf 'domeinen'. Bovendien kon uit de structuur veel worden afgeleid over de werking (het mechanisme) van deze glucansucrase. Een tweede kristaltype liet verassend genoeg zien dat één van de domeinen een heel andere plek innam dan in de eerste structuur. Deze meer compacte vouwing van het enzym wordt in **Hoofdstuk 3** beschreven. Omdat we wilden weten of het verschil tussen langwerpige en compacte vorm functioneel is, bepaalden we ook de vorm van GTF180- Δ N met behulp van de SAXS techniek. In kristallen zijn enzymen namelijk 'gevangen' in een bepaalde vorm, maar voor SAXS experimenten zijn geen kristallen nodig, en kunnen de enzymen vrij bewegen en van vorm veranderen. Voor GTF180- Δ N bleek dat echter niet het geval: in oplossing neemt het enzym alleen de langwerpige vorm aan en niet de compacte.

Met de SAXS techniek konden we ook de 3D vorm van het gehele enzym vaststellen, dus met het deel dat miste in de kristalstructuur. Deze experimenten lieten zien dat ook het complete enzym (GTF180) een vrij langgerekte vorm aanneemt. Uit de vorm van GTF180 was ook de positie van het eerder missende deel af te leiden. Verder bleek dat de vorm niet veel veranderde als het enzym actief (kleine) glucaan ketens maakt.

Ook **Hoofdstuk 4** gaat over een glucansucrase, namelijk GTFA uit *Lactobacillus reuteri* 121. Dit enzym, dat verwant is aan GTF180 uit de eerdere hoofdstukken, heeft een andere specificiteit: het maakt namelijk glucanen met $\alpha(1\rightarrow6)$ - en $\alpha(1\rightarrow4)$ -schakels tussen de bouwstenen in de keten. Ook hier werden de kristallen gemaakt van een deel-enzym (GTFA- Δ N) dat nog steeds actief bleek als het volledige enzym. De kristallen van GTFA- Δ N waren van duidelijk mindere kwaliteit dan die van GTF180- Δ N. Niettemin kon met behulp van de kristallen de 3D structuur van het enzym worden afgeleid. Ondanks de lagere nauwkeurigheid van het 3D model bleek dat we delen van het enzym kunnen aanwijzen die waarschijnlijk bepalend zijn voor de productspecificiteit. De verschillen met GTF180- Δ N zijn vrij klein; het lijkt er dus op dat kleine verschillen in structuur van glucansucrases al genoeg zijn om producten te maken met andere eigenschappen. Dit is bruikbare informatie voor het geval we glucansucrases zo willen aanpassen dat ze specifieke, gewenste glucanen maken.

Hoofdstuk 5 betreft een fructansucrase, namelijk InuJ uit de melkzuurbacterie *Lactobacillus johnsonii* NCC 533; de kristallisatie en de bepaling van de 3D structuur van InuJ worden beschreven. Bijzonder is dat het de eerste gepubliceerde structuur is van een inulosucrase, uit een probiotische bacterie. Inulosucrases maken inuline als product; dit type β -fructan, met $\beta(2\rightarrow1)$ -koppelingen tussen de bouwstenen, heeft interessante prebiotische eigenschappen. Eerder waren al structuren van levansucrases gepubliceerd; met de InuJ structuur konden we dus voor het eerst een vergelijking maken tussen de twee typen bacteriële fructansucrases. De 3D-structuur van InuJ werd ook bepaald in aanwezigheid van het startmateriaal (sucrose), en in complex met een kort product (1-kestose). Deze modellen lieten duidelijk zien hoe en waarom inulosucrases hetzelfde startmateriaal (sucrose) gebruiken als levansucrases. De actieve holtes van de enzymen, waarin de omzetting van sucrose en de stapsgewijze verlenging van de koolhydraatproducten plaatsvindt, zijn namelijk vrijwel identiek. Op de vraag waarom inulo- en levansucrases toch verschillende eindproducten maken - respectievelijk β -fructanen met $\beta(2\rightarrow1)$ - dan wel $\beta(2\rightarrow6)$ -koppelingen - hebben we echter nog steeds geen duidelijk antwoord. Wel kunnen we zeggen dat het erop lijkt dat structurele elementen wat verder weg van de actieve holte hierbij een rol spelen.

References

1. **Abo H., Matsumura T., Kodama T., Ohta H., Fukui K., Kato K. & Kagawa H.** (1991) Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (water-insoluble glucan synthetase). *J. Bacteriol.* **173**, 989-996.
2. **Adams P. D., Afonine P. V., Bunkoczi G., Chen V. B., Davis I. W., Echols N., Headd J. J., Hung L. W., Kapral G. J., Grosse-Kunstleve R. W., McCoy A. J., Moriarty N. W., Oeffner R., Read R. J., Richardson D. C., Richardson J. S., Terwilliger T. C. & Zwart P. H.** (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr.* **D66**, 213-221.
3. **Álvaro-Benito M., de Abreu M., Portillo F., Sanz-Aparicio J. & Fernandez-Lobato M.** (2010a) New insights into the fructosyltransferase activity of *Schwanniomyces occidentalis* β -fructofuranosidase, emerging from nonconventional codon usage and directed mutation. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 7491-7499.
4. **Álvaro-Benito M., Polo A., Gonzalez B., Fernandez-Lobato M. & Sanz-Aparicio J.** (2010b) Structural and kinetic analysis of *Schwanniomyces occidentalis* invertase reveals a new oligomerization pattern and the role of its supplementary domain in substrate binding. *J. Biol. Chem.* **285**, 13930-13941.
5. **Álvaro-Benito M., Sainz-Polo M. A., Gonzalez-Perez D., Gonzalez B., Plou F. J., Fernandez-Lobato M. & Sanz-Aparicio J.** (2012) Structural and kinetic insights reveal that the amino acid pair Gln-228/Asn-254 modulates the transfructosylating specificity of *Schwanniomyces occidentalis* β -fructofuranosidase, an enzyme that produces prebiotics. *J. Biol. Chem.* **287**, 19674-19686.
6. **Anwar M. A., Kralj S., van der Maarel M. J. & Dijkhuizen L.** (2008) The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 3426-3433.
7. **Anwar M. A.** (2010a) How *Lactobacilli* synthesize inulin: characterization of fructosyltransferase enzymes. Chapter 1: General introduction. Fructosyltransferases of lactic acid bacteria: current advancements and emerging concepts. PhD thesis, University of Groningen, The Netherlands.
8. **Anwar M. A., Kralj S., Piqué A. V., Leemhuis H., van der Maarel M. J. & Dijkhuizen L.** (2010b) Inulin and levan synthesis by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains: characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan products. *Microbiology* **156**, 1264-1274.
9. **Anwar M. A., Leemhuis H., Pijning T., Kralj S., Dijkstra B. W. & Dijkhuizen L.** (2012) The role of conserved inulosucrase residues in the reaction and product specificity of *Lactobacillus reuteri* inulosucrase. *FEBS J.* **279**, 3612-3621.
10. **Badel S., Bernardi T. & Michaud P.** (2011) New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* **29**, 54-66.
11. **Balakrishnan M., Simmonds R. S. & Tagg J. R.** (2000) Dental caries is a preventable infectious disease. *Aust. Dent. J.* **45**, 235-245.
12. **Banguela A. & Hernández L.** (2006) Fructans: from natural sources to transgenic plants. *Biotechnología Aplicada* **23**, 202-210.
13. **Barends T. R., Bultema J. B., Kaper T., van der Maarel M. J., Dijkhuizen L. & Dijkstra B. W.** (2007) Three-way stabilization of the covalent intermediate in amylomaltase, an α -amylase-like transglycosylase. *J. Biol. Chem.* **282**, 17242-17249.
14. **Beine R., Moraru R., Nimtzy M., Na'amnieh S., Pawlowski A., Buchholz K. & Seibel J.** (2008) Synthesis of novel fructooligosaccharides by substrate and enzyme engineering. *J. Biotechnol.* **138**, 33-41.

-
15. **Berg J. M., Tymoczko J. L. & Stryer, L.** (2007). *Biochemistry*, 6th ed. W.H. Freeman and Company, New York, USA.
 16. **Binder T. P., Côté G. L. & Robyt J. F.** (1983) Disproportionation reactions catalyzed by *Leuconostoc* and *Streptococcus* glucansucrases. *Carbohydr. Res.* **124**, 275-286.
 17. **Bozonnet S., Dols-Laffargue M., Fabre E., Pizzut S., Remaud-Siméon M., Monsan P. & Willemot R. M.** (2002) Molecular characterization of DSR-E, an α -1,2 linkage-synthesizing dextransucrase with two catalytic domains. *J. Bacteriol.* **184**, 5753-5761.
 18. **Bounaix M.S., Robert H., Gabriel V., Morel S., Remaud-Siméon M., Gabriel B. & Fontagne-Faucher C.** (2010) Characterization of dextran-producing *Weissella* strains isolated from sourdoughs and evidence of constitutive dextransucrase expression. *FEMS Microbiol. Lett.* **311**, 18-26.
 19. **Brison Y., Pijning T., Malbert Y., Fabre E., Mourey L., Morel S., Potocki-Veronese G., Monsan P., Tranier S., Remaud-Siméon M. & Dijkstra B. W.** (2012) Functional and structural characterization of α -(1 \rightarrow 2) branching sucrose derived from DSR-E glucansucrase. *J. Biol. Chem.* **287**, 7915-7924.
 20. **Brzozowski A. M. & Davies G. J.** (1997) Structure of the *Aspergillus oryzae* α -amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* **36**, 10837-10845.
 21. **Buchholz K. & Seibel J.** (2008) Industrial carbohydrate biotransformations. *Carbohydr. Res.* **343**, 1966-1979.
 22. **Cantarel B. L., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V. & Henrissat B.** (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**, D233-8.
 23. **Canutescu A. A., Shelenkov A. A. & Dunbrack R. L., Jr.** (2003) A graph-theory algorithm for rapid protein side-chain prediction. *Protein Sci.* **12**, 2001-2014.
 24. **Carlson T. L., Woo A. & Zheng G. H.** (2009) Methods of making syrups. Patent no. US2009/0123603 A1.
 25. **Carlson T. L., McElwee D., Remmert M. A., Kim C. P. K., Walbert S. & Woo A.** (2011) Low glycemic sweeteners and products made using the same. Patent no. US2011/0097443 A1.
 26. **Chambert R., Treboul G. & Dedonder R.** (1974) Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* **41**, 285-300.
 27. **Chambert R. & Petit-Glatron M. F.** (1991) Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* levansucrase can be separately modulated by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* **279** (1), 35-41.
 28. **Chambert R., Rain-Guion M. C. & Petit-Glatron M. F.** (1992) Readthrough of the *Bacillus subtilis* stop codon produces an extended enzyme displaying a higher polymerase activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1132**, 145-153.
 29. **Chen V. B., Arendall W. B. 3rd, Headd J. J., Keedy D. A., Immormino R. M., Kapral G. J., Murray L. W., Richardson J. S. & Richardson D. C.** (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr.* **D66**, 12-21.
 30. **Chuankhayan P., Hsieh C. Y., Huang Y. C., Hsieh Y. Y., Guan H. H., Hsieh Y. C., Tien Y. C., Chen C. D., Chiang C. M. & Chen C. J.** (2010) Crystal structures of *Aspergillus japonicus* fructosyltransferase complex with donor/acceptor substrates reveal complete subsites in the active site for catalysis. *J. Biol. Chem.* **285**, 23251-23264.
 31. **Colby S. M., McLaughlin R. E., Ferretti J. J. & Russell R. R.** (1999) Effect of inactivation of *gtf* genes on adherence of *Streptococcus downei*. *Oral Microbiol. Immunol.* **14**, 27-32.
 32. **Collaborative Computational Project**, Number 4. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr.* **D50**, 760-763.
 33. **Côté G. L., Sheng S. & Dunlap C. A.** (2008) Alternansucrase acceptor products. *BioCAT. Biotrans.* **26**, 161-168.

-
34. **Crescenzi V.** (1995) Microbial polysaccharides of applied interest: ongoing research activities in Europe. *Biotechnol. Prog.* **11**, 251-259.
 35. **Crittenden R. G. & Doelle H. W.** (1993) Structural identification of oligosaccharides produced by *Zymomonas mobilis* levansucrase. *Biotechnol Lett* **15**, 1055-1060.
 36. **Currie M. A., Cameron K., Dias F. M., Spencer H. L., Bayer E. A., Fontes C. M., Smith S. P. & Jia Z.** (2013) Small angle X-ray scattering analysis of *Clostridium thermocellum* cellulosome N-terminal complexes reveals a highly dynamic structure. *J. Biol. Chem.* **288**, 7978-7985.
 37. **Davies G. J., Wilson K. S. & Henrissat B.** (1997) Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **321(2)**, 557-559.
 38. **Davis I. W., Leaver-Fay A., Chen V. B., Block J. N., Kapral G. J., Wang X., Murray L. W., Arendall W. B. 3rd, Snoeyink J., Richardson J. S. & Richardson D. C.** (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr.* **D66**, 213-221.
 39. **De Vuyst L. & Degeest B.** (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 153-177.
 40. **Devulapalle K. S., Goodman S. D., Gao Q., Hemsley A. & Mooser G.** (1997) Knowledge-based model of a glucosyltransferase from the oral bacterial group of mutans streptococci. *Protein Sci.* **6**, 2489-2493.
 41. **Dobruchowska J. M., Meng X., Leemhuis H., Gerwig G. J., Dijkhuizen L. & Kamerling J. P.** (2013) Gluco-oligomers initially formed by the reuteransucrase enzyme of *Lactobacillus reuteri* 121 incubated with sucrose and malto-oligosaccharides. *Glycobiology* **23 (9)**, 1084-1096.
 42. **Emekli U., Schneidman-Duhovny D., Wolfson H. J., Nussinov R. & Haliloglu T.** (2008) HingeProt: Automated Prediction of Hinges in Protein Structures. *Proteins* **70(4)**, 1219-1227.
 43. **Emond S., Potocki-Veronese G., Mondon P., Bouayadi K., Kharrat H., Monsan P. & Remaud-Siméon M.** (2007) Optimized and automated protocols for high-throughput screening of amylosucrase libraries. *J. Biomol. Screen.* **12**, 715-723.
 44. **Emsley P. & Cowtan K.** (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr.* **D60**, 2126-2132.
 45. **Euzenat O., Guibert A. & Combes D.** (1997) Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochem* **32**, 237-243.
 46. **Euzenat O., Guibert A. & Combes D.** (2006) Production and purification of *Bacillus subtilis* C4 levansucrase: kinetic characterization of the enzyme. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **864**, 288-294.
 47. **Fernández-Tornero C., López R., García E., Giménez-Gallego G. & Romero A.** (2001) A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 1020-1024.
 48. **Flemming H. C. & Wingender J.** (2010) The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 623-633.
 49. **French A. D.** (1988) Accessible conformations of the β -D(2 \rightarrow 1)-linked and -(2 \rightarrow 6)-linked D-fructans inulin and levan. *Carbohydr. Res.* **176**, 17-29.
 50. **French A. D.** (1989) Chemical and physical properties of fructans. *J. Plant Physiol.* **134**, 125-135.
 51. **French A. D., Mouhous-Riou N. & Perez S.** (1993) Computer modeling of the tetrasaccharide nystose. *Carbohydr. Res.* **247**, 51-62.
 52. **German B., Schiffrin E. J., Reniero R., Mollet B., Pfeifer A. & Neeser J. R.** (1999) The development of functional foods: lessons from the gut. *Trends Biotechnol.* **17**, 492-499.
 53. **Gibson G. R. & Roberfroid M. B.** (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **125 (6)**, 1401-1412.
 54. **Giffard P. M. & Jacques N. A.** (1994) Definition of a fundamental repeating unit in streptococcal glucosyltransferase glucan-binding regions and related sequences. *J. Dent. Res.* **73**, 1133-1141.

-
55. **Gouet P., Courcelle E., Stuart D. I. & Metoz F.** (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**, 305-308.
 56. **Greco A., Ho J. G., Lin S. J., Palcic M. M., Rupnik M. & Ng K. K.** (2006) Carbohydrate recognition by *Clostridium difficile* toxin A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 460-461.
 57. **Gryzman A., Carlson T. & Wolever T. M.** (2008) Effects of sucromalt on postprandial responses in human subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* **62**, 1364-1371.
 58. **Hellmuth H., Wittrock S., Kralj S., Dijkhuizen L., Hofer B. & Seibel J.** (2008) Engineering the glucansucrase GTFR enzyme reaction and glycosidic bond specificity: toward tailor-made polymer and oligosaccharide products. *Biochemistry* **47**, 6678-6684.
 59. **Henrissat B. & Davies G.** (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 637-644.
 60. **Hernández L., Arrieta J., Menéndez C., Vazquez R., Coego A., Suárez V., Selman G., Petit-Glatron M. F. & Chambert R.** (1995) Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem. J.* **309** (1), 113-118.
 61. **Homann A., Biedendieck R., Götze S., Jahn D. & Seibel J.** (2007) Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem. J.* **407**, 189-198.
 62. **Homann A. & Seibel J.** (2009a) Chemo-enzymatic synthesis and functional analysis of natural and modified glycostructures. *Nat. Prod. Rep.* **26**, 1555-1571.
 63. **Homann A. & Seibel J.** (2009b) Towards tailor-made oligosaccharides-chemo-enzymatic approaches by enzyme and substrate engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**, 209-216.
 64. **Irague R., Massou S., Moulis C., Saurel O., Milon A., Monsan P., Remaud-Siméon M., Portais J. C. & Potocki-Veronese G.** (2011) NMR-based structural glycomics for high-throughput screening of carbohydrate-active enzyme specificity. *Anal. Chem.* **83**, 1202-1206.
 65. **Irague R., Rolland-Sabate A., Tarquis L., Doublier J. L., Moulis C., Monsan P., Remaud-Siméon M., Potocki-Veronese G. & Buleon A.** (2012) Structure and property engineering of α -D-glucans synthesized by dextransucrase mutants. *Biomacromolecules* **13**, 187-195.
 66. **Ito K., Ito S., Shimamura T., Weyand S., Kawarasaki Y., Misaka T., Abe K., Kobayashi T., Cameron A. D. & Iwata S.** (2011) Crystal structure of glucansucrase from the dental caries pathogen *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Biol.* **408**, 177-186.
 67. **Janeček Š., Svensson B. & Russell R. R.** (2000) Location of repeat elements in glucansucrases of *Leuconostoc* and *Streptococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**, 53-57.
 68. **Jarozewski L., Rychlewski L., Li Z., Li W. & Godzik A.** (2005) FFAS03: a server for profile-profile sequence alignments. *Nucleic Acids Res.* **33**, W284-288.
 69. **Jensen M. H., Mirza O., Albenne C., Remaud-Siméon M., Monsan P., Gajhede M. & Skov L. K.** (2004) Crystal structure of the covalent intermediate of amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*. *Biochemistry* **43**, 3104-3110.
 70. **Kabsch W. & Sander C.** (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577-2637.
 71. **Kabsch W.** (1988) Automatic indexing of rotation diffraction patterns. *J. Appl. Crystallogr.* **21**, 67-71.
 72. **Kabsch W.** (2010) XDS. *Acta Crystallogr. D* **66**, 125-132.
 73. **Kang H. K., Kimura A. & Kim D.** (2011) Bioengineering of *Leuconostoc mesenteroides* glucansucrases that gives selected bond formation for glucan synthesis and/or acceptor-product synthesis. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 4148-4155.
 74. **Kato C., & Kuramitsu H. K.** (1991) Molecular basis for the association of glucosyltransferases with the cell surface of oral streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **63**, 153-157.

75. **Kaur N. & Gupta A. K.** (2002) Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J. Biosci.* **27**, 703-714.
76. **Kelley L. A. & Sternberg M. J.** (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* **4**, 363-371.
77. **Kelly R. M., Dijkhuizen L. & Leemhuis H.** (2009) Starch and α -glucan acting enzymes, modulating their properties by directed evolution. *J. Biotechnol.* **140**, 184-193.
78. **Kim K. H., Chung, C. B., Kim, Y. H., Kim, K. S., Han, C. S. & Kim, C. H.** (2005) Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *J. Cosmet. Sci.* **56**, 395-406.
79. **Kingston K. B., Allen D. M. & Jacques N. A.** (2002) Role of the C-terminal YG repeats of the primer-dependent streptococcal glucosyltransferase, GtfJ, in binding to dextran and mutan. *Microbiology* **148**, 549-558.
80. **Kleerebezem M., Hols P., Bernard E., Rolain T., Zhou M., Siezen R. J. & Bron P. A.** (2010) The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 199-230.
81. **Koepsell H. J., Tsuchiya H. M., Hellman N. N., Kazenko A., Hoffman C. A., Shapre E. S. & Jackson R. W.** (1953) Enzymatic synthesis of dextran; acceptor specificity and chain initiation. *J. Biol. Chem.* **200**, 793-801.
82. **Konarev P. V., Volkov V. V., Sokolova A. V., Koch M. H. J. & Svergun D. I.** (2003) PRIMUS - a Windows-PC based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 1277-1282.
83. **Korakli M., Pavlovic M., Gänzle M. G. & Vogel R. F.** (2003) Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2073-2079.
84. **Koshland D. E.** (1953) Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biological Reviews* **28**, 416-436.
85. **Kozin M. B. & Svergun D. I.** (2001) Automated matching of high- and low-resolution structural models. *J. Appl. Crystallogr.* **34**, 33-41.
86. **Kralj S., van Geel-Schutten G. H., Rahaoui H., Leer R. J., Faber E. J., van der Maarel M. J. & Dijkhuizen L.** (2002) Molecular characterization of a novel glucosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 synthesizing a unique, highly branched glucan with α -(1 \rightarrow 4) and α -(1 \rightarrow 6) glucosidic bonds. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4283-4291.
87. **Kralj S., van Geel-Schutten G. H., Dondorff M. M., Kirsanovs S., van der Maarel M. J. & Dijkhuizen L.** (2004a) Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. *Microbiology* **150**, 3681-3690.
88. **Kralj S., van Geel-Schutten G. H., van der Maarel M. J. & Dijkhuizen L.** (2004b) Biochemical and molecular characterization of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase. *Microbiology* **150**, 2099-2112.
89. **Kralj S., van Geel-Schutten I. G., Faber E. J., van der Maarel M. J. & Dijkhuizen L.** (2005) Rational transformation of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase into a dextransucrase. *Biochemistry* **44**, 9206-9216.
90. **Kralj S., Eeuwema W., Eckhardt T. H. & Dijkhuizen L.** (2006) Role of asparagine 1134 in glucosidic bond and transglycosylation specificity of reuteransucrase from *Lactobacillus reuteri* 121. *FEBS J.* **273**, 3735-3742.
91. **Kralj S., Buchholz K., Dijkhuizen L. & Seibel J.** (2008a) Fructansucrase enzymes and sucrose analogues: A new approach for the synthesis of unique fructo-oligosaccharides. *Biotec. Biotrans.* **26**, 32-41.
92. **Kralj S., van Leeuwen S. S., Valk V., Eeuwema W., Kamerling J. P. & Dijkhuizen L.** (2008b) Hybrid reuteransucrase enzymes reveal regions important for glucosidic linkage specificity and the transglucosylation/hydrolysis ratio. *FEBS J.* **275**, 6002-6010.

-
93. **Kralj S., Vujičić-Žagar A., Pijning T., Tietema M., Dijkstra B. W. & Dijkhuizen L.** (2009) The role of conserved W1065 in acceptor subsite +2 in glucansucrase activity and specificity. Carbohydrate Bioengineering Meeting CBM8, Ischia, Italy.
 94. **Kralj S., Grijpstra P., van Leeuwen S. S., Leemhuis H., Dobruchowska J. M., van der Kaaij R. M., Malik A., Oetari A., Kamerling J. P. & Dijkhuizen L.** (2011) 4,6- α -Glucanotransferase, a novel enzyme that structurally and functionally provides an evolutionary link between glycoside hydrolase enzyme families 13 and 70. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 8154-8163.
 95. **Krissinel E. & Henrick K.** (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr.* **D60**, 2256-2268.
 96. **Laemmli U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
 97. **Lammens W., Le Roy K., Schroeven L., Van Laere A., Rabijns A. & Van den Ende W.** (2009) Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *J. Exp. Bot.* **60**, 727-740.
 98. **Lammens W., Le Roy K., Yuan S., Vergauwen R., Rabijns A., Van Laere A., Strelkov S. V. & Van den Ende W.** (2012) Crystal structure of 6-SST/6-SFT from *Pachysandra terminalis*, a plant fructan biosynthesizing enzyme in complex with its acceptor substrate 6-kestose. *Plant J.* **70**, 205-219.
 99. **Lamzin, V. S., Perrakis, A. & Wilson, K. S.** (2001). The ARP/wARP suite for automated construction and refinement of protein models. In *International tables for crystallography. Volume F: Crystallography of biological macromolecules* (Rossmann, M. G., Arnold, E., eds.), pp. 720-722, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
 100. **Leemhuis H., Kelly R. M. & Dijkhuizen L.** (2009) Directed evolution of enzymes: Library screening strategies. *IUBMB Life* **61**, 222-228.
 101. **Leemhuis H., Pijning T., Dobruchowska J. M., Dijkstra B. W. & Dijkhuizen L.** (2012) Glycosidic bond specificity of glucansucrases: on the role of acceptor substrate binding residues. *BioCAT. Biotrans.* **30**, 366-376.
 102. **Leemhuis H., Pijning T., Dobruchowska J. M., Van Leeuwen S., Dijkstra B. W. & Dijkhuizen L.** (2013a) Glucansucrases: three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *J. Biotechnol.* **163**, 250-272.
 103. **Leemhuis H., Dijkman W. P., Dobruchowska J. M., Pijning T., Grijpstra P., Kralj S., Kamerling J. P. & Dijkhuizen L.** (2013b) 4,6- α -Glucanotransferase activity occurs more widespread in *Lactobacillus* strains and constitutes a separate GH70 subfamily. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 181-193.
 104. **Leslie A. G. W.** (1992) Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography* **26**.
 105. **Lis M., Shiroza T. & Kuramitsu H. K.** (1995) Role of C-terminal direct repeating units of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-S in glucan binding. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2040-2042.
 106. **MacGregor E. A., Jespersen H. M. & Svensson B.** (1996) A circularly permuted α -amylase-type α/β -barrel structure in glucan-synthesizing glucosyltransferases. *FEBS Lett.* **378**, 263-266.
 107. **MacGregor E. A., Janeček Š. & Svensson B.** (2001) Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1546**, 1-20.
 108. **Maiorano A. E., Piccoli R. M., da Silva E. S. & de Andrade Rodrigues M. F.** (2008) Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. *Biotechnol. Lett.* **30**, 1867-1877.
 109. **Malik A., Radji M., Kralj S. & Dijkhuizen, L.** (2009) Screening of lactic acid bacteria from Indonesia reveals glucansucrase and fructansucrase genes in two different *Weissella confusa* strains from soya. *FEMS Microbiol. Lett.* **300**, 131-138.
 110. **Marchessault R. H., Imada K. & Sundararajan P. R.** (1980) Conformation of crystalline type III pneumococcal polysaccharide. *Carbohydr. Res.* **83**, 287-302.

111. **Martinez-Fleites C., Ortiz-Lombardia M., Pons T., Tarbouriech N., Taylor E. J., Arrieta J. G., Hernández L. & Davies G. J.** (2005) Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Glucanacetobacter diazotrophicus*. *Biochem. J.* **390**, 19-27.
112. **Matsumoto-Nakano M., Fujita K. & Ooshima T.** (2007) Comparison of glucan-binding proteins in cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immunol.* **22**, 30-35.
113. **Matthews B. W.** (1968) Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497.
114. **McCoy A. J., Grosse-Kunstleve R. W., Adams P. D., Winn M. D., Storoni L. C. & Read R. J.** (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658-674.
115. **Meng G. & Fütterer K.** (2003) Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 935-941.
116. **Meng G. & Fütterer K.** (2008) Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Struct. Biol.* **8**, 16.
117. **Miller G. L.** (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
118. **Monchois V., Arguello-Morales M. & Russell R. R.** (1999a) Isolation of an active catalytic core of *Streptococcus downei* MFe28 GTF-I glucosyltransferase. *J. Bacteriol.* **181**, 2290-2292.
119. **Monchois V., Vignon M. & Russell R. R.** (1999b) Isolation of key amino acid residues at the N-terminal end of the core region *Streptococcus downei* glucansucrase, GTF-I. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 660-665.
120. **Monchois V., Willemot R. M. & Monsan P.** (1999c) Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 131-151.
121. **Moore N., Chao C., Yang L. P., Storm H., Oliva-Hemker M. & Saavedra J. M.** (2003) Effects of fructo-oligosaccharide-supplemented infant cereal: a double-blind, randomized trial. *Br. J. Nutr.* **90**, 581-587.
122. **Mooser G., Shur D., Lyou M. & Watanabe C.** (1985) Kinetic studies on dextransucrase from the cariogenic oral bacterium *Streptococcus mutans*. *J. Biol. Chem.* **260**, 6907-6915.
123. **Morales-Arrieta S., Rodriguez M. E., Segovia L., López-Munguía A. & Olvera-Carranza C.** (2006) Identification and functional characterization of *levS*, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. *Gene* **376**, 59-67.
124. **Moulis C., Joucla G., Harrison D., Fabre E., Potocki-Veronese G., Monsan P. & Remaud-Siméon M.** (2006) Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucansucrases. *J. Biol. Chem.* **281**, 31254-31267.
125. **Murshudov G. N., Vagin A. A. & Dodson E. J.** (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr.* **D53**, 240-255.
126. **Naessens M., Cerdobbel A., Soetaert W. & Vandamme E. J.** (2005) *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: production, properties and applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **80**, 845-860.
127. **Nagem R. A., Rojas A. L., Golubev A. M., Korneeva O. S., Eneyskaya E. V., Kulminskaya A. A., Neustroev K. N. & Polikarpov I.** (2004) Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition. *J. Mol. Biol.* **344**, 471-480.
128. **Naumoff D. G.** (2001) β -Fructosidase superfamily: homology with some α -L-arabinases and β -D-xylosidases. *Proteins* **42**, 66-76.
129. **Olivares-Illana V., López-Munguía A. & Olvera C.** (2003) Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase. *J. Bacteriol.* **185**, 3606-3612.
130. **Olvera C., Fernández-Vázquez J. L., Ledezma-Candanoza L. & López-Munguía A.** (2007) Role of the C-terminal region of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ in cell anchoring. *Microbiology* **153**, 3994-4002.

-
131. **Ortiz-Soto M. E., Rivera M., Rudino-Pinera E., Olvera C. & López-Munguía A.** (2008) Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Eng. Des. Sel.* **21**, 589-595.
 132. **Otwinowski, Z. & Minor, W.** (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In *Methods in enzymology, volume 276: Macromolecular crystallography, part A* (Carter Jr., C. W., Sweet, R. M., eds.), pp. 407-326, Academic Press (New York) .
 133. **Ozimek L. K., van Hijum S. A., van Koningsveld G. A., van der Maarel M. J., van Geel-Schutten G. H. & Dijkhuizen L.** (2004) Site-directed mutagenesis study of the three catalytic residues of the fructosyltransferases of *Lactobacillus reuteri* 121. *FEBS Lett.* **560**, 131-133.
 134. **Ozimek L. K., Euverink G. J., van der Maarel M. J. & Dijkhuizen L.** (2005) Mutational analysis of the role of calcium ions in the *Lactobacillus reuteri* strain 121 fructosyltransferase (levansucrase and inulosucrase) enzymes. *FEBS Lett.* **579**, 1124-1128.
 135. **Ozimek L. K., Kralj S., Kaper T., van der Maarel M. J. & Dijkhuizen L.** (2006a) Single amino acid residue changes in subsite -1 of inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121 strongly influence the size of products synthesized. *FEBS J.* **273**, 4104-4113.
 136. **Ozimek L. K., Kralj S., van der Maarel M. J. & Dijkhuizen L.** (2006b) The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology* **152**, 1187-1196.
 137. **Painter J. & Merritt E. A.** (2006) TLSMD web server for the generation of multi-group TLS models. *J. Appl. Cryst.* **39**, 109-111.
 138. **Palomba S., Cavella S., Torrieri E., Piccolo A., Mazzei P., Blaiotta G., Ventrino V. & Pepe O.** (2012) Polyphasic screening, homopolysaccharide composition, and viscoelastic behavior of wheat sourdough from a *Leuconostoc lactis* and *Lactobacillus curvatus* exopolysaccharide-producing starter culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 2737-2747.
 139. **Pasteur L.** (1861) Sur la fermentation visqueuse et la fermentation butyrique. *Bulletin De La Société Chimique De Paris* 30-31.
 140. **Petersen S.** (2011) Analysis of mutated glucansucrase (GTF180) enzymes. Practical report, Microbial Physiology, University of Groningen, The Netherlands.
 141. **Petoukhov M. V. & Svergun D. I.** (2005) Global rigid body modelling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophys. J.* **89**, 1237-1250.
 142. **Petoukhov M. V., Konarev P. V., Kikhney A. G. & Svergun D. I.** (2007) ATSAS 2.1 – towards automated and websupported small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.* **40**, s223-s228.
 143. **Petoukhov M. V., Franke D., Shkumatov A. V., Tria G., Kikhney A. G., Gajda M., Gorba C., Mertens H. D. T., Konarev P. V. & Svergun D. I.** (2012) New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.* **45**, 342-350.
 144. **Pijning T., Vujičić-Žagar A., Kralj S., Eeuwema W., Dijkhuizen L. & Dijkstra B. W.** (2008) Biochemical and crystallographic characterization of a glucansucrase from *Lactobacillus reuteri* 180. *BioCAT. Biotrans.* **26**, 12-17.
 145. **Pijning T., Anwar M. A., Böger M., Dobruchowska J. M., Leemhuis H., Kralj S., Dijkhuizen L. & Dijkstra B. W.** (2011) Crystal structure of inulosucrase from *Lactobacillus*: insights into the substrate specificity and product specificity of GH68 fructansucrases. *J. Mol. Biol.* **412**, 80-93.
 146. **Pijning T., Vujičić-Žagar A., Kralj S., Dijkhuizen L. & Dijkstra B. W.** (2012) Structure of the α -1,6/ α -1,4-specific glucansucrase GTFa from *Lactobacillus reuteri* 121. *Acta Crystallogr.* **F68**, 1448-1454.
 147. **Pollock C. J. & Cairns A. J.** (1991) Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 77-101.
 148. **Pons T., Hernández L., Batista F. R. & Chinea G.** (2000) Prediction of a common β -propeller catalytic domain for fructosyltransferases of different origin and substrate specificity. *Protein Sci.* **9**, 2285-2291.

-
149. Pouyez J., Mayard A., Vandamme A. M., Roussel G., Perpete E. A., Wouters J., Housen I. & Michaux C. (2012) First crystal structure of an endo-inulinase, INU2, from *Aspergillus ficuum*: discovery of an extra-pocket in the catalytic domain responsible for its endo-activity. *Biochimie* **94**, 2423-2430.
 150. Rambo R. P. & Tainer J. A. (2011) Characterizing flexible and intrinsically unstructured biological macromolecules by SAS using the Porod-Debye law. *Biopolymers* **95**, 559-571.
 151. Rastall R. A. & Hotchkiss A. T. (2003) Potential for the development of prebiotic oligosaccharides from biomass. ACS Symp Ser. Washington, DC: American Chemical Society.
 152. Reuter G. (2001) The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. *Curr. Iss. Intest. Microbiol.* **2**, 43-53.
 153. Rozen R., Bachrach G., Bronshteyn M., Gedalia I. & Steinberg D. (2001) The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**, 205-210.
 154. Sainz-Polo M. A., Ramirez-Escudero M., Lafraya A., Gonzalez B., Marin-Navarro J., Polaina J. & Sanz-Aparicio J. (2013) Three-dimensional structure of *Saccharomyces* invertase: role of a non-catalytic domain in oligomerization and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **288**, 9755-9766.
 155. Schneidman-Duhovny D., Hammel M. & Sali A. (2010) FoXS: A web server for rapid computation and fitting of SAXS profiles. *Nucleic Acids Res.* **38**, W540-W544.
 156. Schrödinger LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r1.
 157. Seibel J., Moraru R., Götze S., Buchholz K., Na'amnieh S., Pawlowski A. & Hecht H. J. (2006) Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). *Carbohydr. Res.* **341**, 2335-2349.
 158. Shah D. S., Joucla G., Remaud-Siméon M. & Russell R. R. (2004) Conserved repeat motifs and glucan binding by glucansucrases of oral streptococci and *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* **186**, 8301-8308.
 159. Skov L. K., Mirza O., Henriksen A., Potocki de Montalk G., Remaud-Siméon M., Sarcabal P., Willemot R. M., Monsan P. & Gajhede M. (2000) Crystallization and preliminary X-ray studies of recombinant amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*. *Acta Crystallogr.* **D56**, 203-205.
 160. Skov L. K., Mirza O., Sprogøe D., Dar I., Remaud-Siméon M., Albenne C., Monsan P. & Gajhede M. (2002) Oligosaccharide and sucrose complexes of amylosucrase. Structural implications for the polymerase activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 47741-47747.
 161. Song D. D. & Jacques N. A. (1999) Purification and enzymic properties of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem. J.* **341** (2), 285-291.
 162. Stam M. R., Danchin E. G., Rancurel C., Coutinho P. M. & Henrissat B. (2006) Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of α -amylase-related proteins. *Protein Eng. Des. Sel.* **19**, 555-562.
 163. Stevens C. V., Meriggi A., Peristeropoulou M., Christov P. P., Booten K., Levecke B., Vandamme A., Pittevels N. & Tadros T. F. (2001). Polymeric surfactants based on inulin, a polysaccharide extracted from chicory. 1. Synthesis and interfacial properties. *Biomacromolecules* **2** (4), 1256-1259.
 164. Strube C. P., Homann A., Gamer M., Jahn D., Seibel J. & Heinz D. W. (2011) Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs. *J. Biol. Chem.* **286**, 17593-17600.
 165. Stura E. A. & Wilson I. A. (1991) Applications of the streak seeding technique in protein crystallization. *J. Cryst. Growth* **110**, 270-282.
 166. Sutherland I. W. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**, 3-9.

-
167. **Svensson B.** (1994) Protein engineering in the α -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Mol. Biol.* **25**, 141-157.
 168. **Svergun D. I.** (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* **25**, 495-503.
 169. **Svergun D. I., Barberato C. & Koch M. H. J.** (1995) CRY SOL - a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Cryst.* **28**, 768-773.
 170. **Svergun D. I., Petoukhov M. V. & Koch M. H. J.** (2001) Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys. J.* **80**, 2946-2953.
 171. **Támbara Y., Hormaza J. V., Pérez C., León A., Arrieta J. & Hernández L.** (1999) Structural analysis and optimised production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Biotechnol. Lett.* **21**, 117-121.
 172. **Tieking M., Ehrmann M. A., Vogel R. F. & Gänzle M. G.** (2005) Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 655-663.
 173. **Timmermans J. W., de Waard P., Tournois H., Leeflang B. R. & Vliegthart J. F.** (1993) NMR spectroscopy of nystose. *Carbohydr. Res.* **243**, 379-384.
 174. **Tsumori H., Minami, T. & Kuramitsu, H. K.** (1997) Identification of essential amino acids in the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *J. Bacteriol.* **179**, 3391-3396.
 175. **Uitdehaag J. C., Mosi R., Kalk K. H., van der Veen B. A., Dijkhuizen L., Withers S. G. & Dijkstra B. W.** (1999) X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 432-436.
 176. **Uitdehaag J. C. M., van der Veen B. A., Dijkhuizen L. & Dijkstra B. W.** (2002) Catalytic mechanism and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase, a prototypical transglycosylase from the α -amylase family. *Enzyme Microb. Technol.* **30**, 295-304.
 177. **Valluru R. & Van den Ende W.** (2008) Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *J. Exp. Bot.* **59**, 2905-2916.
 178. **Van Geel-Schutten G. H., Faber E. J., Smit E., Bonting K., Smith M. R., Ten Brink B., Kamerling J. P., Vliegthart J. F. & Dijkhuizen L.** (1999) Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3008-3014.
 179. **Van Hijum S. A., van Geel-Schutten G. H., Rahaoui H., van der Maarel M. J. & Dijkhuizen L.** (2002) Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4390-4398.
 180. **Van Hijum S. A., Szalowska E., van der Maarel M. J. & Dijkhuizen L.** (2004) Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology* **150**, 621-630.
 181. **Van Hijum S. A., Kralj S., Ozimek L. K., Dijkhuizen L. & van Geel-Schutten I. G.** (2006) Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 157-176.
 182. **Van Leeuwen S. S., Kralj S., Gerwig G. J., Dijkhuizen L. & Kamerling J. P.** (2008a) Structural analysis of bioengineered α -D-glucan produced by a triple mutant of the glucansucrase GTF180 enzyme from *Lactobacillus reuteri* strain 180: generation of (α 1 \rightarrow 4) linkages in a native (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- α -D-glucan. *Biomacromolecules* **9**, 2251-2258.
 183. **Van Leeuwen S. S., Kralj S., van Geel-Schutten I. H., Gerwig G. J., Dijkhuizen L. & Kamerling J. P.** (2008b) Structural analysis of the α -D-glucan (EPS180) produced by the *Lactobacillus reuteri* strain 180 glucansucrase GTF180 enzyme. *Carbohydr. Res.* **343**, 1237-1250.

184. Van Leeuwen S. S., Kralj S., van Geel-Schutten I. H., Gerwig G. J., Dijkhuizen L. & Kamerling J. P. (2008c) Structural analysis of the α -D-glucan (EPS35-5) produced by the *Lactobacillus reuteri* strain 35-5 glucansucrase GTFA enzyme. *Carbohydr. Res.* **343**, 1251-1265.
185. Van Leeuwen S. S., Kralj S., Eeuwema W., Gerwig G. J., Dijkhuizen L. & Kamerling J. P. (2009) Structural characterization of bioengineered α -D-glucans produced by mutant glucansucrase GTF180 enzymes of *Lactobacillus reuteri* strain 180. *Biomacromolecules* **10**, 580-588.
186. Velázquez-Hernández M. L., Baizabal-Aguirre V. M., Bravo-Patiño A., Cajero-Juárez M., Chávez-Moctezuma M. P. & Valdez-Alarcón J. J. (2009) Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 1763-1778.
187. Vereyken I. J., van Kuik J. A., Evers T. H., Rijken P. J. & de Kruijff B. (2003) Structural requirements of the fructan-lipid interaction. *Biophys. J.* **84**, 3147-3154.
188. Vijn I. & Smeekens S. (1999) Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol.* **120**, 351-360.
189. Volkov V. V. & Svergun D. I. (2003) Uniqueness of *ab-initio* shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 860-864.
190. Von Eichel-Streiber C., Sauerborn M. & Kuramitsu H. K. (1992) Evidence for a modular structure of the homologous repetitive C-terminal carbohydrate-binding sites of *Clostridium difficile* toxins and *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *J. Bacteriol.* **174**, 6707-6710.
191. Vujičić-Žagar A., Pijning T., Kralj S., Lopez C. A., Eeuwema W., Dijkhuizen L. & Dijkstra B. W. (2010) Crystal structure of a 117 kDa glucansucrase fragment provides insight into evolution and product specificity of GH70 enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 21406-21411.
192. Wang Y., Gänzle M. G. & Schwab C. (2010) Exopolysaccharide synthesized by *Lactobacillus reuteri* decreases the ability of enterotoxigenic *Escherichia coli* to bind to porcine erythrocytes. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 4863-4866.
193. Weiss M. S. (2001) Global indicators of X-ray data quality. *J. Appl. Cryst.* **34**, 130-135.
194. Welman A. D. & Maddox I. S. (2003) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.* **21**, 269-274.
195. Winn M. D., Ballard C. C., Cowtan K. D., Dodson E. J., Emsley P., Evans P. R., Keegan R. M., Krissinel E. B., Leslie A. G., McCoy A., McNicholas S. J., Murshudov G. N., Pannu N. S., Potterton E. A., Powell H. R., Read R. J., Vagin A. & Wilson K. S. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr.* **D67**, 235-242.
196. Yanase H., Maeda M., Hagiwara E., Yagi H., Taniguchi K. & Okamoto K. (2002) Identification of functionally important amino acid residues in *Zymomonas mobilis* levansucrase. *J. Biochem.* **132**, 565-572.
197. Yuan S., Le Roy K., Venken T., Lammens W., Van den Ende W. & De Maeyer M. (2012) pKa modulation of the acid/base catalyst within GH32 and GH68: a role in substrate/inhibitor specificity? *PLoS One* **7**, e37453.
198. Zhang R., Zhang W. & Hu T. (2011) Dextran glucosidase: A potential target of iminosugars in caries prevention. *Med. Hypotheses* **76**, 574-575.

.....

Curriculum vitae & Publications



The author of this thesis was born on June 24, 1965 in Scheemda. After successfully finishing the Voorbereidend Wetenschappelijk Onderwijs (VWO) at the Winschoter Scholengemeenschap te Winschoten in 1983, he studied Hoger Laboratorium Onderwijs (HLO-Chemisch) at the Analistenschool Groningen; an internship was done in the research unit Farmacologie & Farmacokinetiek (University of Groningen) of Prof. dr. Dick Meijer, supervised by Dr. Geny Groothuis. In June 1987, the diploma HLO-Chemisch was achieved; from September 1987, the author continued to work in the same research group, working on drug metabolism using perfused rat liver systems.

In January 1990, the author joined the Protein Crystallography group (Biophysical Chemistry) at the University of Groningen, headed by Prof. dr. Wim Hol. In a WHO-funded research project studying 3D structures of glycosomal enzymes from *Trypanosoma*, crystallization of such enzymes was one of the main tasks. From 1993, the author was involved in many research projects aiming at crystallization and structure determination of proteins, supervised by Prof. dr. Bauke Dijkstra. Over the last decade, in a collaboration with the Microbial Physiology research group (Prof. dr. Lubbert Dijkhuizen), the author focused on structural studies (crystallization, structure determination) of carbohydrate-processing enzymes from *Lactobacillus* species. It is this line of research that is described in this thesis.

.....

PUBLICATIONS

1. **Braakman I., Pijning T., Verest O., Weert B., Meijer D. K. & Groothuis G. M.** (1989) Vesicular uptake system for the cation lucigenin in the rat hepatocyte. *Mol. Pharmacol.* **36**, 537-542.
2. **Braakman I., Verest O., Pijning T., Meijer D. K. & Groothuis G. M.** (1989) Zonal distribution of the cation lucigenin in rat liver: influence of taurocholate. *Mol. Pharmacol.* **36**, 532-536.
3. **Nijssen H. M., Pijning T., Meijer D. K. & Groothuis G. M.** (1991) Mechanistic aspects of uptake and sinusoidal efflux of dibromosulphophthalein in the isolated perfused rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 1997-2002.
4. **Nijssen H. M., Pijning T., Meijer D. K. & Groothuis G. M.** (1992) Influence of albumin on the net sinusoidal efflux of the organic anion dibromosulphophthalein from rat liver. *Hepatology* **15**, 302-309.
5. **Verlinde C. L., Witmans C. J., Pijning T., Kalk K. H., Hol W. G., Callens M. & Opperdoes F. R.** (1992) Structure of the complex between trypanosomal triosephosphate isomerase and N-hydroxy-4-phosphono-butanamide: binding at the active site despite an 'open' flexible loop conformation. *Protein Sci.* **1**, 1578-1584.
6. **Nijssen H. M., Pijning T., Proost J. H., Meijer D. K. & Groothuis G. M.** (1994) The sinusoidal efflux of dibromosulphophthalein from rat liver is stimulated by albumin, ligandin and fatty acid binding protein but not by other dibromosulphophthalein binding proteins. *J. Hepatol.* **21**, 29-36.
7. **van Montfort R. L., Pijning T., Kalk K. H., Schuurman-Wolters G. K., Reizer J., Saier M. H., Jr, Robillard G. & Dijkstra B. W.** (1994) Crystallization of enzyme IIB of the cellobiose-specific phosphotransferase system of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **239**, 588-590.
8. **van Montfort R. L., Pijning T., Kalk K. H., Reizer J., Saier M. H., Jr, Thunnissen M. M., Robillard G. T. & Dijkstra B. W.** (1997) The structure of an energy-coupling protein from bacteria, IIBcellobiose, reveals similarity to eukaryotic protein tyrosine phosphatases. *Structure* **5**, 217-225.
9. **Bordo D., van Montfort R. L., Pijning T., Kalk K. H., Reizer J., Saier M. H., Jr & Dijkstra B. W.** (1998) The three-dimensional structure of the nitrogen regulatory protein IIANtr from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **279**, 245-255.
10. **van Montfort R. L., Pijning T., Kalk K. H., Hangyi I., Kouwijzer M. L., Robillard G. T. & Dijkstra B. W.** (1998) The structure of the *Escherichia coli* phosphotransferase IIAmannitol reveals a novel fold with two conformations of the active site. *Structure* **6**, 377-388.
11. **Fusetti F., Schroter K. H., Steiner R. A., van Noort P. I., Pijning T., Rozeboom H. J., Kalk K. H., Egmond M. R. & Dijkstra B. W.** (2002) Crystal structure of the copper-containing quercetin 2,3-dioxygenase from *Aspergillus japonicus*. *Structure* **10**, 259-268.
12. **Fusetti F., Pijning T., Kalk K. H., Bos E. & Dijkstra B. W.** (2003) Crystal structure and carbohydrate-binding properties of the human cartilage glycoprotein-39. *J. Biol. Chem.* **278**, 37753-37760.
13. **Alagaratnam S., van Pouderooyen G., Pijning T., Dijkstra B. W., Cavazzini D., Rossi G. L., Van Dongen W. M., van Mierlo C. P., van Berkel W. J. & Canters G. W.** (2005) A crystallographic study of Cys69Ala flavodoxin II from *Azotobacter vinelandii*: structural determinants of redox potential. *Protein Sci.* **14**, 2284-2295.

14. **Boersma Y. L., Dröge M. J., van der Sloot A. M., Pijning T., Cool R. H., Dijkstra B. W. & Quax W. J.** (2008) A novel genetic selection system for improved enantioselectivity of *Bacillus subtilis* lipase A. *Chembiochem* **9**, 1110-1115.
15. **Boersma Y. L., Pijning T., Bosma M. S., van der Sloot A. M., Godinho L. F., Dröge M. J., Winter R. T., van Pouderoyen G., Dijkstra B. W. & Quax W. J.** (2008) Loop grafting of *Bacillus subtilis* lipase A: inversion of enantioselectivity. *Chem. Biol.* **15**, 782-789.
16. **Pijning T., Vujičić-Žagar A., Kralj S., Eeuwema W., Dijkhuizen L. & Dijkstra B. W.** (2008) Biochemical and crystallographic characterization of a glucansucrase from *Lactobacillus reuteri* 180. *Biocat. Biotrans.* **26**, 12-17.
17. **Pijning T., van Pouderoyen G., Kluskens L., van der Oost J. & Dijkstra B. W.** (2009) The crystal structure of a hyperthermoactive exopolysaccharuronase from *Thermotoga maritima* reveals a unique tetramer. *FEBS Lett.* **583**, 3665-3670.
18. **Kale A., Pijning T., Sonke T., Dijkstra B. W. & Thunnissen A. M.** (2010) Crystal structure of the leucine aminopeptidase from *Pseudomonas putida* reveals the molecular basis for its enantioselectivity and broad substrate specificity. *J. Mol. Biol.* **398**, 703-714.
19. **Vujičić-Žagar A., Pijning T., Kralj S., Lopez C. A., Eeuwema W., Dijkhuizen L. & Dijkstra B. W.** (2010) Crystal structure of a 117 kDa glucansucrase fragment provides insight into evolution and product specificity of GH70 enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 21406-21411.
20. **Palomo M., Pijning T., Booiman T., Dobruchowska J. M., van der Vlist J., Kralj S., Planas A., Loos K., Kamerling J. P., Dijkstra B. W., van der Maarel M. J., Dijkhuizen L. & Leemhuis H.** (2011) *Thermus thermophilus* glycoside hydrolase family 57 branching enzyme: crystal structure, mechanism of action, and products formed. *J. Biol. Chem.* **286**, 3520-3530.
21. **Pijning T., Anwar M. A., Böger M., Dobruchowska J. M., Leemhuis H., Kralj S., Dijkhuizen L. & Dijkstra B. W.** (2011) Crystal structure of inulosucrase from *Lactobacillus*: insights into the substrate specificity and product specificity of GH68 fructansucrases. *J. Mol. Biol.* **412**, 80-93.
22. **Anwar M. A., Leemhuis H., Pijning T., Kralj S., Dijkstra B. W. & Dijkhuizen L.** (2012) The role of conserved inulosucrase residues in the reaction and product specificity of *Lactobacillus reuteri* inulosucrase. *FEBS J.* **279**, 3612-3621.
23. **Augustyniak W., Brzezinska A. A., Pijning T., Wienk H., Boelens R., Dijkstra B. W. & Reetz M. T.** (2012) Biophysical characterization of mutants of *Bacillus subtilis* lipase evolved for thermostability: Factors contributing to increased activity retention. *Protein Sci.* **21**, 487-497.
24. **Brison Y., Pijning T., Malbert Y., Fabre E., Mourey L., Morel S., Potocki-Veronese G., Monsan P., Tranier S., Remaud-Siméon M. & Dijkstra B. W.** (2012) Functional and structural characterization of α -(1 \rightarrow 2) branching sucrose derived from DSR-E glucansucrase. *J. Biol. Chem.* **287**, 7915-7924.
25. **Leemhuis H., Pijning T., Dobruchowska J. M., Dijkstra B. W. & Dijkhuizen L.** (2012) Glycosidic bond specificity of glucansucrases: on the role of acceptor substrate binding residues. *Biocat. Biotrans.* **30**, 366-376.
26. **Pijning T., Vujičić-Žagar A., Kralj S., Dijkhuizen L. & Dijkstra B. W.** (2012) Structure of the α -1,6/ α -1,4-specific glucansucrase GTFA from *Lactobacillus reuteri* 121. *Acta Crystallogr.* **F68**, 1448-1454.
27. **Akbulut N., Tuzlakoglu Öztürk M., Pijning T., İşsever Öztürk S. & Gümüşel F.** (2013) Improved activity and thermostability of *Bacillus pumilus* lipase by directed evolution. *J. Biotechnol.* **164**, 123-129.

-
28. **Leemhuis H., Pijning T., Dobruchowska J. M., Van Leeuwen S., Dijkstra B. W. & Dijkhuizen L.** (2013) Glucansucrases: three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *J. Biotechnol.* **163**, 250-272.
 29. **Leemhuis H., Dijkman W. P., Dobruchowska J. M., Pijning T., Grijpstra P., Kralj S., Kamerling J. P. & Dijkhuizen L.** (2013) 4,6- α -Glucanotransferase activity occurs more widespread in *Lactobacillus* strains and constitutes a separate GH70 subfamily. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 181-193.