

IMPORTANCIA DE LAS PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO EN CEREALES (PROLAMINAS)

Nayelli Hernández-Espinosa^{1a}, Mónica Reyes-Reyes²,
Francisco Erik González-Jiménez³, Lucila Concepción Núñez-Bretón²
Bárbara Leslie Cooper-Bribiesca^{4b}

RESUMEN

Las prolaminas son proteínas de almacenamiento presentes en el endospermo de algunos cereales, ricas en los aminoácidos (AA) prolina y glutamina. Actualmente las prolaminas han sido estudiadas por diversos grupos de investigación debido a sus propiedades funcionales, principalmente la extensibilidad y la elasticidad, además por su relación con la patología gastrointestinal crónica denominada Enfermedad Celíaca (EC). Estas proteínas se caracterizan por tener un dominio globular α -hélice con 6-8 residuos de cisteína y 3-4 puentes disulfuro, siendo altamente solubles en etanol (40-70%). Se clasifican en tres clases: prolaminas ricas en azufre (α , β , γ gliadinas), prolaminas pobres en azufre (ω gliadina) y prolaminas de alto peso molecular y de acuerdo al cereal del cual se extraen reciben su nombre: secalina (centeno), hordeína (cebada), avenina (avena), zeína (maíz), orzeína (arroz), kafirina (sorgo) y gliadina (trigo). Estas proteínas (excepto avenina) están involucradas con la EC, recientemente se ha encontrado relación con el péptido α -gliadina compuesto por 33 AA (33-mer) el cual se cree que es responsable de esta enteropatía. El objetivo de esta revisión es dar a conocer la importancia y las características de las prolaminas presentes en algunos cereales los cuales representan una parte fundamental en la alimentación a nivel mundial.

Palabras Clave: Prolaminas, cereales.

The Importance of the Storage Proteins in Cereals (Prolamins)

ABSTRACT

Prolamins are the storage proteins present in the endosperm of some cereals, they are rich in amino acids (AA) Proline and Glutamine. Prolamins have been studied by several research groups nowadays because of their functional properties, mainly the extensibility and elasticity besides their relationship with the chronic gastrointestinal disease called Celiac disease (CD). These proteins are characterized by having α -helix globular domain with 6-8 cysteine residues and 3-4 disulfide bonds being highly soluble in ethanol (40-70%). Prolamins are classified into three different types: sulfur-rich prolamins (α -, β - γ gliadins), sulfur-poor prolamins (ω -gliadins) and high molecular weight prolamins. On the other hand they get their names from the cereal source they are extracted from, for example: secalin (rye), hordein (barley), avenin (oats), zein (corn), orzein (rice), kafirin (sorghum) and gliadin (wheat). These proteins (except avenin) are associated with the CD and have recently been related to an α -gliadin peptide composed of 33 AA (33-mer) which are believed to be responsible for causing this enteropathy. The aim of this review is to show the importance and characteristics of prolamins present in some cereals which are crucial in the worldwide feeding.

Key Words: Prolamines, cereals.

ARTÍCULO RECIBIDO EL 02 DE MARZO DEL 2015 Y ACEPTADO EL 08 DE ABRIL DEL 2015.

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. ²Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. ³Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN. Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos. ⁴Facultad de Química, UNAM. Departamento de Alimentos y Biotecnología.

E-mails: ^aespinosanayeli@hotmail.com, ^bbcooper@linuxmail.org

INTRODUCCIÓN

Las prolaminas son proteínas de almacenamiento presentes en la mayoría de los cereales y representan una importante fuente de proteínas en la alimentación animal y humana. Su nombre se deriva de la predominancia de dos aminoácidos prolina y glutamina, estos AA permiten que las prolaminas sean altamente solubles en compuestos orgánicos. Las proteínas que pertenecen a esta familia se caracterizan por la presencia de un dominio globular α -hélice, conservando un patrón de seis a ocho residuos de cisteína y tres a cuatro puentes disulfuro intramoleculares. Además de conservar la cisteína, existen pequeñas secuencias de aminoácidos similares entre subfamilias.

Osborne (1907), clasificó a estas proteínas en cuatro clases de acuerdo a la solubilidad que presentaban en los siguientes disolventes: agua, cloruro de sodio, etanol o álcalis. Realizando extracciones sucesivas con estos disolventes logró recuperar albuminas (agua), globulinas (NaCl 0.1 M), prolaminas (etanol 40-70 %), la cuarta clase de proteínas (residuos de proteína) conocidas como glutelinas, solo pueden extraerse con disolventes como 2-mercaptoetanol o DTT (ditiotreitól) pues son capaces de romper los puentes disulfuro intramoleculares.

Aproximadamente, entre el 70-90% de las proteínas de almacenamiento en los cereales tienen proporciones similares de prolamina y glutelina. Excepciones a esto es la avena que contiene 80% de globulinas y el arroz con 1-5 % de prolaminas y 80-90 % de glutelinas¹.

Existen dos características que relacionan a estas proteínas. La primera es que todas las fracciones proteínicas de cereales son solubles en alcohol al 70% y, por lo tanto, se clasifican como prolaminas. La segunda radica en su agrupación de acuerdo a sus similitudes teniendo un arreglo similar en secuencias de aminoácidos y cDNA, existen tres clases: a) prolaminas ricas en azufre (α -, β -, γ -gliadinas), b) prolaminas pobres en azufre-monómeros con azufre, haciendo enlaces disulfuro intramoleculares, incluye ω -gliadina (trigo), ω -secalina (centeno) y c-hordeína (cebada) y c) prolaminas de alto peso molecular².

CARACTERÍSTICAS DE LAS PROLAMINAS GLIADINA (PROLAMINA DE TRIGO)

Son proteínas de almacenamiento en el trigo, ricas en prolina y glutamina, solubles en alcohol (etanol, 1 y 2-propanol), con masas moleculares que varían desde 20,000 a 70,000 daltones (Da)³, se caracterizan por estar asociadas al incremento de viscosidad (h) y extensibilidad en las masas de trigo. La mayoría de estas proteínas están presentes como monómeros y han sido clasificadas en cuatro grupos de acuerdo a su movilidad en geles de electroforesis (α -, β -, γ -, ω -gliadinas). Sin embargo, investigaciones recientes reflejan que la α - y β -gliadinas pertenecen al mismo grupo⁴. Las γ - y ω -gliadinas son codificadas por genes del loci (*Gli-1*) presente en el brazo corto de los cromosomas del grupo 1, estos genes están estrechamente

ligados a los que codifican para las G-BPM (Gluteninas de Bajo Peso Molecular *Glu-3*) influyendo directamente en las características de fuerza del gluten. Las α - y β -gliadinas son codificadas por genes del loci *Gli-2* localizadas en el brazo corto de los cromosomas del grupo 6.⁵ Su estructura primaria consiste en un dominio central (DC) hidrofílico teniendo secuencias repetidas de AA ricos en glutamina (Gln) y prolina (Pro). El dominio central (DC) está rodeado por dos dominios terminales (DT) conteniendo bajos niveles de Gln y Pro y altos niveles de AA hidrofóbicos. Además, casi todos los AA ionizables que están presentes en bajas concentraciones, se presentan en el dominio carboxilo terminal (C-DT). Las gliadinas del tipo α - y γ - presentan un pequeño dominio amino-terminal (N-DT) conteniendo solo algunos residuos de AA y un largo DC y C-DT. Las ω -gliadinas, presentan un largo DC el cual abarca del 90 al 96% de la secuencia de la proteína el cual tiene un corto N-DT y C-DT. La presencia de partes hidrofóbicas e hidrofílicas en α - y γ -gliadinas conducen a propiedades anfífilas⁶.

SECALINA (PROLAMINA DEL CENTENO)

Las secalinas son proteínas de almacenamiento solubles en alcohol (prolaminas) principalmente presentes en el centeno, representan alrededor del 50% del nitrógeno total de la semilla⁷. Estas se encuentran como una mezcla polimórfica de polipéptidos y han sido clasificados en cuatro grupos de acuerdo a su movilidad en geles electroforéticos: a) secalinas de alto peso molecular (de 100,000 Da o más), b) γ -secalinas (40,000 Da), c) γ -secalinas (75 000 Da) y d) ω -secalinas (pesos moleculares alrededor de 50,000 Da). Estos grupos han sido purificados y caracterizados demostrando tener una relación estructural con los grupos de prolaminas presentes en cereales como la cebada y trigo¹.

HORDEÍNA (PROLAMINA DE CEBADA)

La hordeína representa la principal proteína de almacenamiento en la cebada, se clasifica en 4 grupos de acuerdo a su movilidad electroforética: B, C, D y γ -hordeína. Las fracciones B (70-80%) y C (10-12%), representan el total proteínico (hordeína), mientras que las fracciones D y γ - son componentes minoritarios⁸. La proporción de cada una de estas fracciones se ve influenciada por las condiciones de crecimiento (metabolismo), principalmente por la disponibilidad de nitrógeno⁹.

El peso molecular para la fracción B-hordeína se encuentra entre 36,000 y 44,000 Da con 250-360 residuos de AA, mientras que la C-hordeína varía entre 55,000 y 70,000 Da. Estas fracciones consisten en repeticiones de octapéptidos (Pro-Gln- Gln-Pro-Phe-Pro-Gln-Gln) con al menos tres pentapéptidos relacionados (Pro-Gln-Gln-Pro-Tyr)¹⁰. Se sintetiza durante la última etapa de llenado del grano y es depositada en los cuerpos proteínicos que se distorsionan y rompen durante este proceso, formando una matriz proteínica dentro de las células del endospermo.

La movilización de esta proteína depende de la síntesis y actividad de peptidasas y proteasas dentro del embrión

durante la germinación, por lo antes mencionado hay variabilidad en la calidad del malteado en la elaboración de la cerveza⁹.

AVENINA (PROLAMINA DE AVENA)

La avena junto con el arroz son dos cereales en los cuales las prolaminas no representan la mayor cantidad de proteínas de reserva. Las globulinas son las principales proteínas de almacenamiento en la avena. Se han identificado tres tipos: 3, 7, y 12S globulinas, siendo la 12S la fracción mayoritaria. Las aveninas, prolaminas de la avena son altamente polimórficas con pesos moleculares que van de los 20,000 a los 40,000 Da. Aún no ha sido aceptada alguna nomenclatura para estas proteínas, sin embargo, algunas investigaciones las han clasificado en tres grupos: α -, β -, γ -avenina, basados en la nomenclatura para gliadinas¹¹.

Estas prolaminas son ricas en azufre, conteniendo bajas concentraciones de aminoácidos básicos y alto contenido de ácido glutámico y prolina. Generalmente se extraen con 70% (v/v) de etanol, sin reducción de los enlaces disulfuro. En el grano de avena, existen inclusiones de prolaminas dentro de la matriz de globulina en el endospermo, pero no en la capa de aleurona¹².

La avenina presenta algunas propiedades interesantes, por ejemplo, se asemeja al gluten en cuanto a sus propiedades mecánicas, que han demostrado ser un buen material para la elaboración de películas comestibles al presentar propiedades elásticas, mientras que la mayoría de los materiales biopoliméricos son frágiles. Otro aspecto importante es que las personas que sufren la enfermedad celíaca, al consumir avenina no sufren los síntomas característicos al no existir interacción intestinal con esta proteína. La avenina puede ser empleada en diversos rubros como material de envasado de alimentos o recubrimiento. Muchas prolaminas, muestran la máxima solubilidad en etanol al 50 y 90% (w/w), mientras que la avenina muestra su máxima solubilidad en 45% de etanol, lo que indica que la avenina es más hidrofílica que otras prolaminas. Su peso molecular se ha establecido mediante electroforesis en gel, en un rango de 20,000 y 30,000 Da, aunque su nomenclatura no es totalmente aceptada la mayoría de los autores las catalogan como α -, β -, γ - basados en la nomenclatura de las gliadinas del trigo¹³.

ZEÍNA (PROLAMINA DEL MAÍZ)

El grano de maíz presenta un contenido de proteína que varía entre el 7 y 12%, siendo el 50% de este valor prolaminas las cuales son conocidas como zeínas. Las zeínas se localizan principalmente en el endospermo del grano¹⁴ siendo su principal y única función la de almacenar nitrógeno para la germinación del embrión. Estas prolaminas se producen en pequeños y compactos cuerpos proteínicos unidos por puentes disulfuro, embebidos en la matriz de glutelina y se distribuyen generalmente en las capas externas del endospermo.

Existen cuatro tipos de zeínas: α -, β -, γ - y δ -¹⁵ cada una con diferencias de peso molecular, secuencia de aminoácidos y solubilidad. La α -zeína representa aproximadamente el 70% de las zeínas y está conformada por dos grupos de pesos moleculares de 19,000 y 22,000 Da¹⁶. Su extracción se efectúa principalmente con etanol.

ORZEÍNA (PROLAMINA DEL ARROZ)

El contenido de proteína en el grano de arroz oscila entre 7 y 8%, de esta cantidad solo el 5% lo constituye la orzeína¹⁷. Esta prolamina se acumula en cuerpos proteínicos tipo I. El arroz también presenta diversos grupos de prolaminas. La primera presenta un peso molecular de 10,000 Da y es muy rica en aminoácidos azufrados. La otra es una prolamina de 13,000 Da, la cual se divide en dos tipos: A (mayor), consiste en más de siete grupos polipeptídicos y, B (menor), en más de cinco grupos polipeptídicos. La última prolamina de este grupo exhibe un peso molecular de 16,000 Da y contiene grandes cantidades de aminoácidos azufrados, pero se carece de información acerca de su estructura¹⁸.

KAFIRINA (PROLAMINA DEL SORGO)

La kafirina es la prolamina presente en el sorgo, la cual se extrae y se separa bajo condiciones reductoras dando lugar a diversos componentes con pesos moleculares que van desde 15,000 a 30,000 Da aproximadamente, han sido clasificadas en tres grupos denominados α -, β -, γ -kafirinas basado en sus relaciones con las zeínas en cuanto a composición y secuencia de aminoácidos, pesos moleculares y reacciones inmunoquímicas cruzadas¹⁹. La α -kafirina comprende entre el 80 y 84% del total de la fracción del endospermo vítreo y un 66-71% en el endospermo opaco²⁰, conformada por dos grupos de pesos moleculares aproximadamente de 23,000 y 25,000 Da²¹.

Watterson y cols.²⁰ reportaron que la β -kafirina representa entre el 7 y 8% del total de las kafirinas del endospermo vítreo y del 10-13% en el endospermo opaco, comprendiendo tres grupos: 15,000, 17,000 y 18,000 Da como las β -zeínas. La γ -kafirina se encuentra presente en el endospermo vítreo del 9 y 12%, mientras que en el endospermo opaco del 19-21%. Se tienen dos secuencias disponibles, ambas corresponden a proteínas maduras alrededor de 20,000 Da. La secuencia de sus aminoácidos son 99% idénticos y similares a los de γ -zeínas, excepto por cuatro repeticiones presentes (Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu)²².

CELIAQUÍA; ENTEROPATÍA DESENCADENADA POR LAS PROLAMINAS

Las prolaminas son responsables de causar en cierto grupo de personas reacciones alérgicas, tal es el caso de la enfermedad celíaca (EC), la cual se refiere a una enteropatía causada por la sensibilidad al consumir alimentos que contengan algún tipo de prolamina, aunque comúnmente se le asocia a esta enteropatía con la ingesta de alimentos que contengan gluten. Este desorden crónico es fácilmente reconocible cuando se presenta en sus formas clásicas provocando diarrea, hinchazón, flatulencias,

VERTIENTES

pérdida de peso y una evidente mala absorción de nutrientes. En la actualidad, en la parte occidental del mundo hay una incidencia de 1:100 y en la parte oriental de 1:300²³.

Se considera que los alérgenos responsables de la EC se deben a la secuencia repetida de aminoácidos encontrados en las proteínas de almacenamiento de cereales²⁴. De acuerdo a esto, se sugiere una clasificación de prolaminas (Tabla 1) con respecto a su estructura fundamental, dichas prolaminas se considera que participan en la EC. Dentro de la prolaminas más estudiadas asociadas a la EC se encuentran las presentes en el trigo (gliadina y glutenina).

Experimentalmente, se ha demostrado *in vitro*, que después de digerir la gliadina existen regiones que no son digeridas, produciéndose un péptido de α -gliadina compuesto por 33 AA (33-mer)²⁵. Se ha encontrado la secuencia de péptidos de este compuesto a saber: LQLQPFPPQQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (P-prolina; Q-glutamina; L-leucina; F-fenilalanina; Y-tirosina), siendo particularmente interesante por dos razones. La primera, toda la prolamina pudo ser fragmentada por procesos digestivos, sin embargo, este péptido 33-mer se mantuvo intacto al pasar de la exposición prolongada a proteasas. La segunda, la producción de tres distintos tipos de células T que se realiza cuando se reconocen los siguientes péptidos presentes en el fragmento 33-mer: PFPQQLPY, PQQLPYPQ y PYPQQLPY²⁶.

Se ha reportado que esta enteropatía se debe a ciertas lesiones en el intestino delgado (acortamiento de las vellosidades), enfermedad crónica autoinmune que se activa por consumir prolaminas²⁷. Debido a esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) adoptaron en 1976 el término “alimentos libres de gluten”, con la finalidad de establecer estándares de calidad en la elaboración de alimentos destinados a personas celíacas. Además, el *Codex Alimentarius*²⁸ define a estos alimentos como aquéllos que pueden contener gluten de

trigo, arroz, cebada o avena en una proporción que no exceda los 20 mg/kg.

PERSPECTIVAS

Actualmente, la designación ‘dietas libres de gluten’ se emplea en dietas que contienen cero cantidad de gluten, sin embargo, esto no es necesariamente cierto. En algunos países, como Estados Unidos y Canadá, estas dietas están basadas en alimentos como el arroz y maíz, mientras que en otros países, como Escandinavia y Reino Unido, se incluyen pequeñas cantidades de almidón y gluten de trigo que no afectarán a los enfermos con enfermedad celíaca²⁸. No obstante, el *Codex Alimentarius* establece que los alimentos denominados ‘libres de gluten’ pueden tener ciertas cantidades de prolaminas, implementando esta normatividad en diversos países por décadas²⁸.

Por ello, ante la creciente demanda de productos libres de gluten enfocada a la población con enfermedad celíaca, es necesario realizar investigaciones que ayuden a determinar la cantidad de prolaminas que puedan consumir sin riesgos las personas afectadas con esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Shewry PR, Bradberry D, Franklin J, White RP. The chromosomal locations and linkage relationships of the structural genes for the prolamins storage proteins (secalins) of rye. *Theor Appl Genet* 1984, 69: 63-69.
2. Owusu-Apenten R. Food Protein Analysis: Quantitative effects on processing. *Food Sci Tech* 2002, 118: 488.
3. Shewry P, Halford N. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Botany* 2002, 53: 947-958.
4. Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol* 2007, 24: 115-119.
5. Naeem H, Paulon D, Irmak S, MacRitchie F. Developmental and environmental effects on the assembly of glutenin polymers and the impact on grain quality of wheat. *J Cereal Sci* 2012, 56: 51-57.

Prolaminas	Fuentes de Cereales		
	Trigo	Centeno	Cebada
Monomérica	γ -Gliadina β -Gliadina α -Gliadina	γ -Secalina	γ -Hordeína
Polimérica	Glutenina (bajo peso molecular)		B-Hordeína
Pobres en azufre	ω -Gliadina	ω -Secalina	C-Hordeína
Alto peso molecular	Glutenina	Secalina	D-Hordeína

Modificado de Tatham AS y Shewry PR, 1995²⁴.

Tabla 1. Prolaminas involucradas en la enfermedad celíaca.

6. Thewissen BG, Celus I, Brijis K, Delcour JA. Foaming properties of wheat gliadin. *J Agric Food Chem* 2011, 59: 1370-1375.
7. Shewry PR, Parmar S, Mifflin BJ. The extraction, separation and polymorphism of the prolamin storage proteins (secalins) of rye. *Cereal Chem* 1983, 60: 1-6.
8. Qi Jun-Cang, Chen Jin-Xin, Zhang Guo-Ping. Protein and hordein fraction content in barley seeds as affected by sowing date and their relations to malting quality. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005, 6(11): 1069-1075.
9. Howard KA, Gayler KR, Eagles HA, Halloran GM. The relationship between D hordein and malting quality in barley. *J Cereal Sci* 1996, 24: 47-53.
10. Shewry P. and Tatham AS. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *J Biochem* 1990, 267: 1-12.
11. Thompson T. Wheat starch, gliadin, and the gluten-free diet. *J Am Diet Assoc* 2001, 1456-1459.
12. Londono DM, Van't Westende WP, Goryunova S, Salentijn EM, Van den Broeck HC, Van der Meer IM, Visser RG, Gilissen LJ, Smulders MJ. Avenin diversity analysis of the genus *Avena* (oat). Relevance for people with celiac disease. *J Cereal Sci* 2013, 58: 170-177.
13. Shewry PR. Avenins: The prolamins of oats. Shewry PR, Casey R, editors. In: *Seed proteins*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999: 79-92.
14. Wilson MC. Proteins of the kernel. Watson, SA and Ramstad, PT (eds). In: *Corn: Chemistry and Technology*. Saint Paul, MN: American Association of Cereal Chemist, 1987: 273-277.
15. Coleman CE, Larkins BA. 1999. The prolamins of maize. Shewry PR, Casey R (eds). In: *Seed proteins*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999: 109-139.
16. Thompson GA, Larkins BA. Structural elements regulating zein gene expression. *BioEssays* 1998, 10: 108-113.
17. Mandac BE, Juliano BO. Properties of prolamin and developing rice grain. *Phytochem* 1978, 17: 611-614.
18. Mitsukawa N, Tanaka K. Rice endosperm proteins and their accumulation signals. 1991; 503-511. In: *Rice Genetics II: Proceedings of the Second International Rice Genetics Symposium*. Philippines: International Rice Research Institute, 1990. Available from: URL: <https://irri.org/>
19. Mazhar H, Chandrashekar A, Shetty HS. Isolation and immunochemical characterization of the alcohol-extractable proteins (kafirins) of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J Cereal Sci* 1993, 17: 83-93.
20. Watterson JJ, Shull JM, Kirleis AW. Quantitation of α -, band γ -kafirins in vitreous and opaque endosperm of *Sorghum bicolor*. *Cereal Chem* 1993, 70: 452-457.
21. Shull JM, Watterson JJ, Kirleis AW. Proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (kafirins) of *Sorghum bicolor* (L. Moench) based on molecular weight, solubility and structure. *J Agric Food Chem* 1991, 39: 83-87.
22. Belton PS, Delgadillo I, Halford NG, Shewry PR. Kafirin structure and functionality. *J Cereal Sci* 2006, 44: 272-286.
23. Crowe SE. Celiac Disease. DeLegge MH editor. In: *Clinical Gastroenterology: Nutrition and Gastrointestinal Disease*. New Jersey: Human Press Inc., 2008: 123-147.
24. Tatham AS, Shewry PR. The S-poor prolamins of wheat, barley and rice. Mini Review. *J Cereal Sci* 1995, 22: 1-16.
25. Parada A, Araya M. El gluten. Su historia y efectos en la enfermedad celíaca. *Rev Med Chile* 2010, 138: 1319-1325.
26. Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray G, Sollid L, Khosla C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Sci* 2002, 297: 2275-2279.
27. Cinova J, De Palma G, Stepankova R, Kofronova O, Kverka M, Sanz Y, Tuckova L. Role of intestinal bacteria in gliadin-induced changes in intestinal mucosa: study in germ-free rats. *PLoS ONE*, 2011, 6(1): e16169.
28. FAO/WHO. Codex Alimentarius Standard. Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten. Codex Stan-118-1981. Revised 2008. Available from: URL: <https://www.ccnfsdu.de>