

## NGHIÊN CỨU TRÍCH LY ASTAXANTHIN TỪ PHÉ LIỆU VỎ CUA BIỂN (*Scylla paramamosain*) BẰNG DẦU HƯƠNG DƯƠNG

Nguyễn Thị Ngọc Hoài<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Trường Đại học Công nghiệp thực phẩm thành phố Hồ Chí Minh

\*Tác giả liên lạc: [hoaintn@hufi.edu.vn](mailto:hoaintn@hufi.edu.vn)

### TÓM TẮT

Astaxanthin là chất màu thuộc nhóm carotenoid có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh cùng một số chức năng sinh học quan trọng. Trong quá trình sản xuất chitin/chitosan từ vỏ cua, chúng ta có thể tách chiết và thu nhận astaxanthin có giá trị sử dụng cao, đồng thời giảm thiểu ô nhiễm môi trường. Nghiên cứu này nhằm xác định nhiệt độ, thời gian và tỷ lệ dung môi chiết astaxanthin thích hợp. Vỏ cua được ngâm chiết bằng dầu hướng dương với tỷ lệ dầu hướng dương/vỏ cua là (1/1-5/1), ngâm chiết ở (60-100°C), trong (1-5 giờ). Hàm lượng astaxanthin cao nhất thu được là 147,58µg/ml với tỷ lệ dầu hướng dương/vỏ cua là 3/1, nhiệt độ 90°C và ngâm trong thời gian 5 giờ.

**Từ khóa:** Astaxanthin, vỏ cua, dầu hướng dương

## RESEARCH OF EXTRACTION ASTAXANTHIN FROM CRAB SHELLS (*Scylla paramamosain*) BY SUNFLOWER OIL

Nguyen Thi Ngoc Hoai<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> HCM City University Of Food Industry, No 140 Le Trong Tan St., Tay Thanh Ward,  
Tan Phu Dist., Ho Chi Minh City

\*Corresponding Author: [hoaintn@hufi.edu.vn](mailto:hoaintn@hufi.edu.vn)

### ABSTRACT

Astaxanthin is a pigment of the carotenoid group with strong antioxidant activity and several important biological functions. During the production of chitin / chitosan from crab shells, we can extract and obtain high value astaxanthin, while minimizing environmental pollution. This study aimed to determine the appropriate temperature, time and solvent extraction rate of astaxanthin. Crab shells are soaked in sunflower oil with the ratio of sunflower oil / crab shells (1/1-5/1), soaked at (60-100°C), for (1-5 hours). The highest astaxanthin content obtained was 147.58µg / ml with the soybean oil / crab shell ratio 3/1, at 90°C and soaked for 5 hours.

**Key words:** Astaxanthin, crab shell, sunflower oil.

### MỞ ĐẦU

Theo báo cáo của tỉnh Cà Mau năm 2019, toàn tỉnh có khoảng 70% diện tích nuôi tôm-rừng, tôm quảng canh truyền thống, tôm-lúa đều có thả nuôi cua kết hợp, tổng diện tích ước đạt khoảng 100.000 ha, năng suất đạt bình quân 40-50 kg/ha/năm, tương ứng khoảng 5.000 tấn/năm. Trong quá trình chế biến cua, phần thải ra gồm mai và xương lên đến 50% khối lượng cua. Trong thành phần phế liệu cua, hàm lượng chitin chiếm 16-20%, hàm lượng khoáng 60-70%, hàm lượng protein 10-

15%, hàm lượng astaxanthin chiếm 1-3%. Trong thực tế sản xuất, phế liệu cua dễ bị ươn thối gây tổn thất các thành phần có giá trị và ô nhiễm môi trường đáng kể. Trong vỏ cua, astaxanthin là thành phần rất dễ bị oxy hóa, gây lãng phí nguồn hợp chất quý tự nhiên.

Astaxanthin là một hợp chất có nhiều tác dụng đã được công nhận, đặc biệt trong lĩnh vực y dược. Các nghiên cứu gần đây cho thấy astaxanthin là chất có khả năng chống oxy hóa mạnh, có lợi cho hệ miễn dịch, hệ cơ tim, điều trị ung thư và trong

điều trị lão hóa da (Rao et al., 2014) [1]. Astaxanthin là carotenoid giá trị cao nhất hiện đang được sử dụng trong nhiều các ngành công nghiệp và dược phẩm. Các nghiên cứu mới đã gợi ý rằng astaxanthin là một chất chống oxy hóa mạnh mẽ có khả năng cao hơn các loại khác carotenoids (cao gấp 10 lần so với zeaxanthin, lutein,  $\beta$ -carotene và cantaxanthin; Miao và cộng sự, 2013)[2] và các vitamin, có thể có hiệu quả cao trong việc giảm DNA thiệt hại, cải thiện hệ thống miễn dịch, gan và chức năng tim bằng cách làm tăng quá trình sản xuất kháng thể và tế bào T, bảo vệ ánh sáng tia cực tím, viêm, thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi tác và ung thư, loại bỏ lipid peroxidation trong màng tế bào và thúc đẩy sức khỏe tim mạch bằng cách sửa đổi mức cholesterol trong huyết tương (Miao et al., 2006)[3].

Các nghiên cứu cho thấy rằng đặc tính chống oxy hóa của astaxanthin cao gấp 10 lần so với beta-caroten, gấp 100÷500 lần so với vitamin E (Miki, 1991)[4], ngoài ra còn cao hơn lutein và zeaxanthin. Đặc tính chống oxy hóa của astaxanthin được xem là nguồn lợi lớn cho sức khỏe của con người.

Chính vì astaxanthin có nhiều tác dụng quan trọng nên cũng có rất nhiều nghiên cứu thu nhận astaxanthin như Jinxia và cộng sự (2019) [5] đã nghiên cứu ngâm chiết astaxanthin từ vỏ tôm bằng ethanol. Hui Ni (2008) đã nghiên cứu cho biết việc chiết xuất astaxanthin theo các phương pháp qua xử lý axit, kiềm hay nhiệt độ có thể dẫn đến sự phá hủy một lượng lớn astaxanthin [6]. Theo Hanif Hooshmand et al. (2017): khi chiết carotenoid từ phế liệu cua, năng suất carotenoid cao nhất thu được bằng cách chiết với dầu hướng dương là 0,97 mg/g [7]. Tương tự, năng suất khai thác carotenoid từ chất thải của bằng dầu đậu nành 0,181 mg/g, dầu mè 0,161 mg/g và dầu cám gạo 0,159 mg/g. Theo Anderson (1975) đã đưa ra quy trình trích ly carotenoid từ phế liệu tôm trong

dung môi dầu nành [8]. Dầu nành được cho vào phế liệu sau đó trộn lẫn vào với nhau và giữ ở một nhiệt độ nhất định. Dầu nành sau đó được tách bằng cách ly tâm, quá trình trích ly carotenoid bằng dầu từ phế liệu giáp xác có thể kết hợp với quá trình sản xuất chitin – chitosan (M.N. Sachira và cộng sự, 2004) [9].

Chính vì vậy, việc nghiên cứu trích ly astaxanthin từ phế liệu vỏ cua bằng dầu hướng dương nhằm tận dụng được nguồn chứa astaxanthin vào một số ứng dụng hữu ích như làm thực phẩm chức năng cho con người, góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

## NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Nguyên vật liệu

#### Nguyên liệu

Vỏ cua biển (*Scylla paramamosain*) được chọn là đối tượng nghiên cứu.

Dầu hướng dương Tường An

Thành phần: 100% dầu hướng dương nguyên chất tinh luyện.

Sản phẩm của: Công ty cổ phần dầu thực vật Tường An

#### Thu mẫu và bảo quản mẫu

Vỏ cua được lấy từ nguyên liệu của chế biến tại Công ty cổ phần chế biến XNK thủy sản tỉnh Bà Rịa-Vũng Tàu. Nguyên liệu sau khi lấy được vận chuyển ngay bằng thùng xốp cách nhiệt có bảo quản nước đá, nhiệt độ < 5°C về phòng thí nghiệm. Nguyên liệu trước khi sử dụng được rửa sạch, để ráo trong thời gian 5 phút. Trong trường hợp chưa làm ngay thì rửa sạch, được bao gói và mang đi bảo quản đông ở điều kiện nhiệt độ -20°C tại phòng thí nghiệm Trung tâm thí nghiệm thực hành Trường Đại học Công nghiệp thực phẩm Tp Hồ Chí Minh.

#### Phương pháp nghiên cứu

#### Thí nghiệm khảo sát nhiệt độ chiết astaxanthin thích hợp

Vỏ cua sau khi rửa đông được làm sạch, sấy khô và nghiền nhỏ bằng cối chày gỗ.

Cân chính xác 10 g vỏ cua khô nghiền nhỏ, ngâm vào dầu hướng dương theo tỷ lệ dầu hướng dương/ vỏ cua là 3/1. Bịt kín bình và miệng bình tam giác để tránh ánh sáng.

Bình tam giác chứa hỗn hợp dầu hướng dương, vỏ cua được đem cho vào bể ổn nhiệt ở nhiệt độ từ 60°C, 70°C, 80°C, 90°C và 100°C trong thời gian cố định là 3 giờ. Sau khi trích ly, tách riêng phần vỏ cua, thu được dịch dầu chứa astaxanthin. Đem dịch này định mức đến 50 ml và lọc qua giấy lọc trong điều kiện không ánh sáng. Dịch lọc được đem đi đo quang phổ ở bước sóng 468nm. Dựa vào độ hấp thụ ánh sáng vừa đo và phương trình đường chuẩn astaxanthin để xác định hàm lượng astaxanthin của mẫu thí nghiệm.

#### ***Thí nghiệm khảo sát thời gian chiết astaxanthin thích hợp***

Vỏ cua sau khi rửa đông được làm sạch, sấy khô và nghiền nhỏ bằng cối chày gỗ.

Cân chính xác 10 g vỏ cua khô nghiền nhỏ, ngâm vào dầu hướng dương theo tỷ lệ dầu hướng dương/ vỏ cua là 3/1. Bịt kín bình và miệng bình tam giác để tránh ánh sáng.

Bình tam giác chứa hỗn hợp dầu, vỏ cua được đem cho vào bể ổn nhiệt ở nhiệt độ thích hợp thu được ở thí nghiệm trên trong thời gian từ 1, 2, 3, 4 và 5 giờ. Sau khi trích ly, dịch chiết được xử lý tương tự thí nghiệm trên

#### ***Thí nghiệm khảo sát tỷ lệ dung môi chiết astaxanthin***

Vỏ cua sau khi rửa đông được làm sạch, sấy khô và nghiền nhỏ bằng cối chày gỗ.

Cân chính xác 10 g vỏ cua khô nghiền nhỏ, ngâm vào dầu hướng dương theo tỷ lệ dầu hướng dương/ vỏ cua theo các tỷ lệ 1/1-5/1. Bịt kín bình và miệng bình tam giác để tránh ánh sáng.

Bình tam giác chứa hỗn hợp dầu, vỏ cua được đem cho vào bể ổn nhiệt ở nhiệt độ và thời gian thích hợp thu được ở thí nghiệm trên.

Sau khi trích ly, dịch chiết được xử lý tương tự các thí nghiệm trên

#### **Phương pháp phân tích**

##### **Phương pháp phân tích hàm lượng ẩm**

Hàm lượng ẩm trong vỏ cua được phân tích theo tiêu chuẩn ISO 1442:1997 [10]

##### **Phương pháp phân tích hàm lượng astaxanthin trong vỏ cua**

Hàm lượng astaxanthin trong vỏ cua được phân tích theo phương pháp của Metusalach và Tolasa và cộng sự [11]. Cân chính xác 1g mẫu cho vào ống đồng hóa (hay cốc thủy tinh). Thêm 5ml dung môi chứa hexan hay isopropanol với tỷ lệ 3:2 (v/v). Đồng hóa trong 2 phút với tốc độ 15000 vòng/ phút. Để yên 30 phút. Sau đó tiến hành lọc qua giấy lọc Whatman No.1. Tách chiết 3 lần. Dịch chiết được đựng trong bình chiết và bổ sung thêm nước muối sinh lý với tỷ lệ 1:2. Lắc nhẹ bình chiết và để yên trong 10 phút ở nhiệt độ phòng cho tách pha hoàn toàn. Tách bỏ pha dưới, lấy pha hexan bên trên. Sau đó, rửa pha hexan bằng nước muối sinh lý. Tiến hành cô quay chân không ở 40°C để bay hơi hexan. Hòa tan mẫu với ete dầu mỏ và định mức 10ml. Sau đó, tiến hành pha loãng mẫu và đo độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 468nm ( $A_{468}$ ), dùng eter dầu mỏ làm dung dịch so sánh.

Hàm lượng astaxanthin tổng số trong mẫu được tính theo công thức của Saito và Regier (1971)

$$C(\mu\text{g/g mẫu}) = \frac{A.D.V}{0,2.G}(\text{g})$$

Trong đó:

C: là hàm lượng astaxanthin ( $\mu\text{g/g}$  mẫu)

A: độ hấp thụ của dung dịch ở 468nm

V: thể tích pha loãng (ml)

D: hệ số pha loãng

G: trọng lượng mẫu khô

0,2: là độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 468nm của  $1\mu\text{g/ml}$  astaxanthin chuẩn

##### **Phương pháp xử lý số liệu**

Số liệu trình bày trong bài báo này là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm. Sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0,05$ ) của các giá trị trung bình được phân tích trên phần mềm SPSS.

**KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN'**

**Kết quả kiểm tra thành phần hóa học vỏ cua**

**Bảng 1.** Thành phần hóa học của vỏ cua biển

Thành phần	Độ ẩm	Protein	Tro khoáng	Astaxanthin
%	11 ± 0,5%	16 ± 0,52%	51 ± 1,1%	211 ± 0,5mg/kg

Nguyên liệu vỏ cua sau khi mua ở Công ty cổ phần chế biến XNK thủy sản tỉnh Bà Rịa-Vũng Tàu được đem đi kiểm tra độ ẩm, hàm lượng protein, hàm lượng tro khoáng tại phòng thí nghiệm, hàm lượng Astaxanthin được kiểm tra tại Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh.

Kết quả cho thấy trong phế liệu vỏ cua, thành phần tro khoáng chiếm tỷ trọng lớn nhất đạt 51%, tiếp đến là hàm lượng protein chiếm 16 % so với hàm lượng chất khô, độ ẩm vỏ cua khoảng 11%, hàm lượng astaxanthin là 211mg/kg. Từ những phân tích thành phần hóa học của vỏ cua ở trên cho thấy, hàm lượng astaxanthin trong vỏ cua khá cao, nên quy trình chế biến phế liệu cua cần quan tâm thu hồi các thành phần có giá trị này.

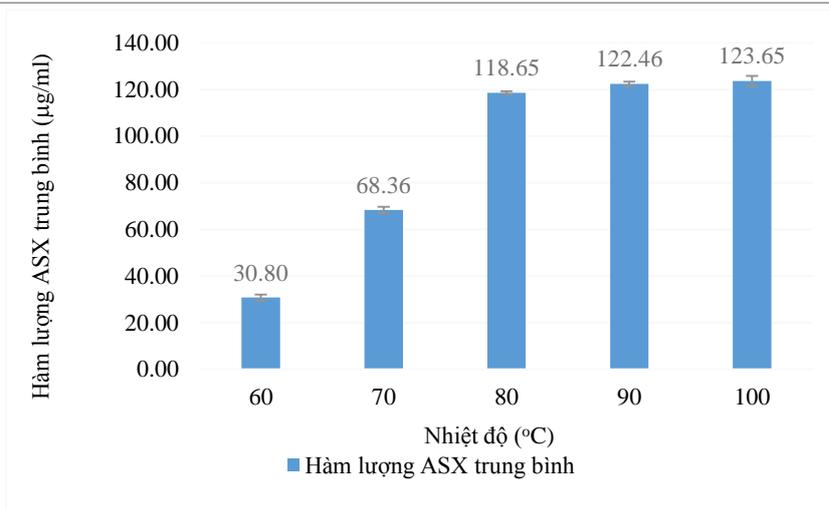
**Kết quả khảo sát nhiệt độ chiết astaxanthin thích hợp**

Khi nhiệt độ chiết thay đổi, nhiệt độ tăng dần từ 60°C đến 100°C ta thấy hàm lượng astaxanthin tăng cao. Dựa trên kết quả nghiên cứu ta thấy rằng: hàm lượng astaxanthin thu được thấp nhất ở 60°C (30,80 µg/ml). Hàm lượng astaxanthin thu được cao nhất ở 100°C (123,65 µg/ml) nhưng vì ở nhiệt độ 90°C và 100°C hàm lượng astaxanthin khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p > 0,05$ ) nên có thể chọn nhiệt độ chiết thích hợp nhất là ở

90°C (122,46 µg/ml). Điều này được lý giải như sau: nhiệt độ cao làm tăng độ hòa tan astaxanthin từ nguyên liệu vào dung môi, giảm độ nhớt nên hệ số khuếch tán tăng và làm tăng tốc độ quá trình trích ly. Theo Hanif Hooshmand et al. (2017): khi chiết carotenoid từ phế liệu cua, năng suất carotenoid cao nhất thu được bằng cách chiết với dầu hương dương là 0,97 mg/g. Sachindra và Mahendrakar (2005) đã quan sát thấy nhiệt độ chiết trên 70°C làm giảm năng suất carotenoid từ phế liệu tôm. Do đó, các điều kiện tối ưu cho việc khai thác các carotenoids bằng dầu hương dương được báo cáo là tỷ lệ dầu/ phế liệu là 2: 1, ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 150 phút.

Tuy nhiên, để đạt được kết quả tương tự đối với chất thải từ cua, cần nhiều nhiệt lượng hơn so với phế liệu tôm do hình thái của cua có lớp vỏ dày hơn. Chen và Meyers (1982) thu được sản lượng sắc tố tối đa từ phế liệu bằng cách sử dụng dầu đậu nành với tỷ lệ dầu/phế liệu là 1: 1. Phương pháp này là làm nóng phế liệu bằng dầu ở nhiệt độ 80–90°C trong 30 phút.

Qua kết quả ở hình 1 cho thấy lựa chọn nhiệt độ chiết ở 90°C là thích hợp nhất và thu được hàm lượng astaxanthin cao nhất.



**Hình 1.** Đồ thị biểu diễn sự ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng astaxanthin thu được.

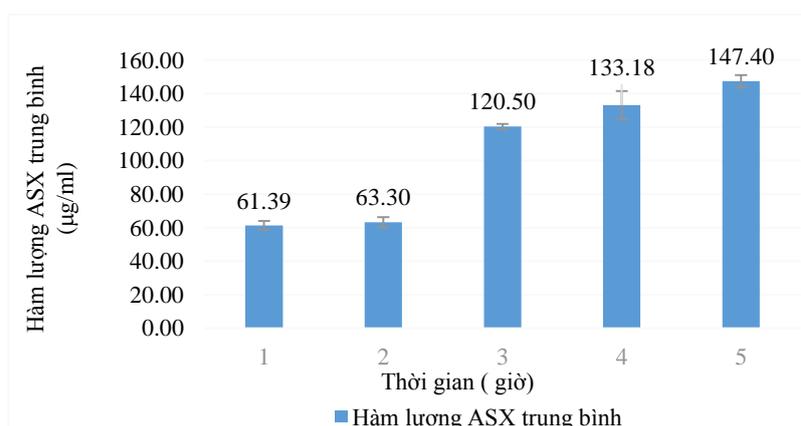
### Kết quả khảo sát thời gian chiết astaxanthin thích hợp

Khi tăng thời gian chiết từ 1 giờ đến 5 giờ, hàm lượng astaxanthin trong dịch chiết cũng tăng dần.

Ở thời gian chiết 1 giờ, hàm lượng astaxanthin trong dịch chiết thu được là 61,39 µg/ml và thời gian chiết 2 giờ là 63,30 µg/ml. Hàm lượng astaxanthin thu được ở thời gian chiết 1 giờ, 2 giờ là thấp nhất và giữa 2 giá trị này không có sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p > 0,05$ ).

Hàm lượng astaxanthin thu được cao nhất ở thời gian chiết 5 giờ (146,40 µg/ml). Khi thời gian chiết dài, có đủ thời gian để dung môi dầu hướng dương và vỏ cua tiếp xúc với nhau nên dung môi sẽ hòa tan hoàn toàn dung chất trong nguyên liệu vỏ cua. Tuy nhiên khi thời gian chiết vượt mức tối ưu thì hàm lượng astaxanthin tăng không đáng kể mà còn làm tăng chi phí trong quá trình chiết.

Qua kết quả ở hình 2 cho thấy lựa chọn thời gian chiết ở 5 giờ là thích hợp nhất để thu được hàm lượng astaxanthin cao nhất.



**Hình 2.** Đồ thị biểu diễn sự ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng astaxanthin thu được

### Kết quả khảo sát tỷ lệ dung môi chiết astaxanthin thích hợp

Khi tỷ lệ dầu hướng dương/vỏ cua tăng dần từ 1/1 đến 3/1 thì hàm lượng astaxanthin thu được cũng tăng nhanh và

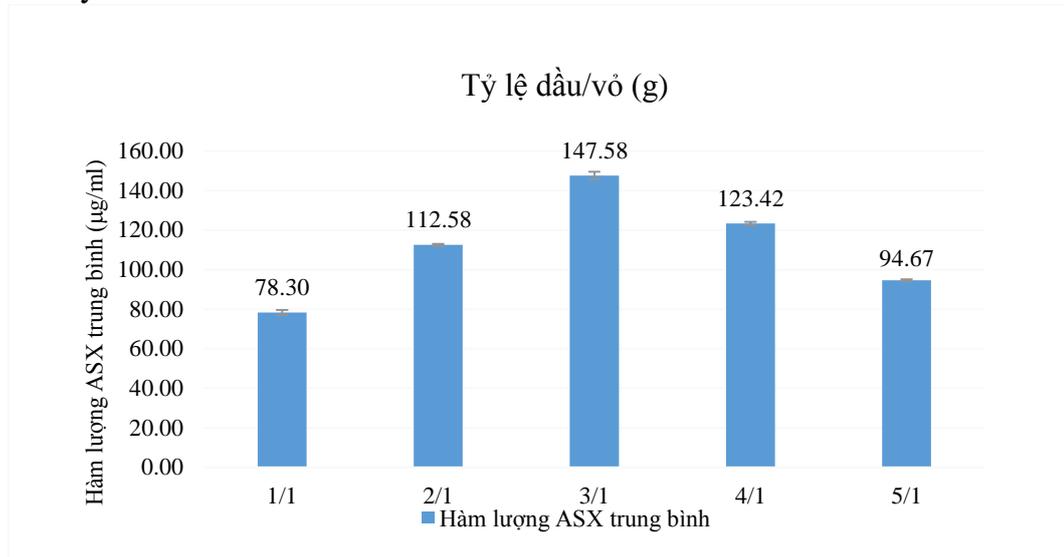
giữa các nghiệm thức có sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0,05$ ).

Hàm lượng astaxanthin thu được thấp nhất ở tỷ lệ dầu/ vỏ là 1/1 (78,30 µg/ml) vì ở tỷ lệ dung môi thấp thì dung môi

không đủ ngập hoàn toàn để hòa tan astaxanthin có trong vỏ cua nên hàm lượng astaxanthin thu được thấp.

Hàm lượng astaxanthin thu được cao nhất ở tỷ lệ 3/1 (147,58 µg/ml). Khi tiếp tục tăng tỷ lệ dầu hướng dương/vỏ cua từ 3/1 dầu sau này.

đến 5/1 thì hàm lượng astaxanthin thu hồi giảm, ở tỷ lệ 3/1 (147,58 µg/ml) đến tỷ lệ 5/1 (94,67 µg/ml). Khi tỷ lệ dung môi và nguyên liệu ở 5/1 thì nồng độ astaxanthin trong dung dịch dầu bị loãng, sẽ gây khó khăn cho quá trình xử lý



**Hình 3.** Đồ thị biểu diễn sự ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi chiết đến hàm lượng astaxanthin thu được

Qua kết quả ở hình 3 cho thấy lựa chọn tỷ lệ dung môi chiết 3/1 (g) là thích hợp nhất để thu được hàm lượng astaxanthin cao nhất.

### KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Hàm lượng astaxanthin thu được chịu ảnh hưởng của các nhân tố như: nhiệt độ chiết, thời gian chiết và tỷ lệ dung môi/mẫu. Ngoài ra còn một số nhân tố khác không được nghiên cứu trong bài báo này.

Điều kiện thích hợp để trích ly astaxanthin từ vỏ cua đối với dung môi dầu hướng dương là: Nhiệt độ trích ly là 90°C, thời gian trích ly là 5 giờ, tỉ lệ dung môi/mẫu

là 3:1, hàm lượng astaxanthin thu được ở chế độ tối lưu là 147,58 µg/ml.

Để nâng cao hiệu suất thu hồi astaxanthin, nên tiến hành trích ly astaxanthin nhiều lần để tăng hiệu suất thu hồi astaxanthin. Mặc khác, tiến hành trích ly trên các loại dung môi dầu thực vật khác nhau như dầu mè, dầu nành, dầu hạt cải... và các loại dung môi hữu cơ khác để so sánh quy trình cụ thể từ đó tìm ra dung môi thích hợp nhất cho quá trình trích ly. Sau khi trích ly phải tìm biện pháp thích hợp để tách astaxanthin ra khỏi dung môi và sấy khô astaxanthin. Khảo sát thời gian bảo quản của dầu chứa astaxanthin so với dung môi dầu ban đầu

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- RANGA RAO AMBATI, SIEW MOI PHANG, SARADA RAVI AND RAVISHANKAR GOKARE ASWATHANARAYANA- ASTAXANTHIN (2014). *Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its commercial applications-A review*, Marine Drugs 12 (1), page.128-152.
- FENGPING MIAO, YAHONG GENG, DAYAN LU, JINCHENG ZUO (2013). *Stability and changes in astaxanthin ester composition from Haematococcus pluvialis during storage*, Chinese Journal of Oceanology and Limnology 31 (6), page1181-1189.
- FENGPING MIAO, YAHONG GENG, DAYAN LU, JINCHENG ZUO (2006) - *Characterization of astaxanthin esters in Haematococcus pluvialis by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*, Anal. Biochem., 352, page. 176–181.
- MIKI W.(1991), *Biological functions and activities of animal carotenoids*, Pure Appl. Chem., 63, page.141–146.
- JINXIA HU, WEIHANG LU, MEI LV, YUNLONG WANG, RUIFANG DING, LITAO WANG (2019). *Extraction and purification of astaxanthin from shrimp shell and the effects of different treatments on its content*. Revista Brasileira de Farmacognosia, Volume 29 (1), 24-29.
- HANIF HOOSHMAND VÀ CỘNG SỰ (2017). *Optimization of carotenoids extraction from blue crab (Portunuspelagicus) and shrimp (Penaeus semisulcatus) wastes using organic solvents and vegetable oils*, Journal of Food Processing and Preservation, Iran.
- HUI NI, QI-HE CHEN, GUO-QING HE, GUANG-BIN WU, YUAN-FAN YANG (2008). *Optimization of acidic extraction of astaxanthin from Phaffia rhodozyma*. Journal of Zhejiang University science, 9 (1), page 51-59
- ANDERSON, LYLE K. (1975). *Extraction of Carotenoid Pigment from Shrimp Processing Waste*. U.S. Patent 3906112.
- M.N. SACHIRA VÀ CỘNG SỰ (2004). *Process optimization for extraction of carotenoid from shrimp waste vegetable*. Bioresource technology India.
- ISO 937:1978 Meat and Meat Products – Determination of Nitrogen Content (Reference Method).
- METUSALACH, BROWN, J.A., SHAHIDI, F. (1997). *Effects of stocking density on colour characteristics and deposition of carotenoids in cultured Arctic charr (Salvelinus alpinus)*. Food Chemistry, 59, 107–114.