

蜂蛹蛋白质酶解工艺及其氨基酸口服液对小鼠的强壮作用*

张海生, 陈锦屏

(陕西师范大学 食品工程系, 陕西 西安 710062)

[摘要] 研究了蜂蛹蛋白质的酶解工艺以及蜂蛹氨基酸口服液对小鼠的强壮作用。结果表明, 1398 中性蛋白酶可以对蜂蛹蛋白质进行有效水解, 其最佳工艺条件为: 酶浓度 0.65%, 料液比 1:14, 在 50 °C 下酶解 4 h, 游离氨基酸的生成量可达 224.98 mg/g 干蜂蛹。蜂蛹氨基酸口服液可以有效增加小鼠体重, 提高小鼠血液红细胞数量以及血红蛋白、血清总蛋白浓度, 提高受试小鼠的脏器系数。表明蜂蛹氨基酸口服液对幼年雄性小鼠具有很好的强壮作用。

[关键词] 蜂蛹; 蛋白酶; 氨基酸口服液; 强壮作用

[中图分类号] S896.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)01-0110-06

Strengthening effect of honeybee pupa amino acid drink on mice

ZHANG Hai-sheng, CHEN Jin-ping

(Food Engineering Department, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China)

Abstract: The enzyme hydrolyzation technology of honeybee pupa protein and strengthening effect of honeybee pupa drink for mice were studied in this test. The results showed that the honeybee pupa protein could be hydrolyzed by neutral proteinase. The optimal technique was: enzyme concentration 0.65%, temperature 50 °C, time 4 h, honeybee pupa: solvent 1:14; and 224.98 mg/g AA could be produced by this technology. The honeybee pupa drink could effectively increase weight, amounts of blood RBC and PLT, concentration of Hb and serum TP, viscera coefficient of mice and these results showed that the honeybee pupa drink had an evident strengthening effect for young mice.

Key words: honeybee pupa; proteinase; amino acid drink; strengthening effect

蜂蛹是蜂王在蜂房产的卵孵化成幼虫后经过 7 d 的生长发育进入蛹期, 从进入蛹期到羽化前的蜜蜂躯体。蜂蛹主要包括工蜂蛹和雄蜂蛹, 目前国际上作为商品的主要为雄蜂蛹。雄蜂蛹含有丰富的营养物质, 其干物质中含蛋白质 440.1 g/kg, 脂肪 260.9 g/kg, 碳水化合物 203.4 g/kg, 灰分 44.6 g/kg, 总糖 7.3 g/kg, 几丁质 43.7 g/kg。蛋白质中含有 18 种氨基酸, 人体必须的 8 种氨基酸种类齐全, 占氨基酸总量的 39.39%^[1]。另外, 蜂蛹中还含有丰富的矿物质元素、维生素、激素、酶类和黄酮类化合物, 是一种优质的食品资源^[2]。食用蜂蛹能增进食欲, 改善睡眠, 增强体质, 提高机体免疫力^[2], 治疗妇女更年期

潮热症^[3]。我国是世界上最大的养蜂大国, 蜜蜂资源丰富, 蜂群数量约 600~700 万箱, 居世界首位, 干雄蜂蛹年产量可达 4 000 t 以上^[2]。但目前对蜂蛹的研究较少, 蜂蛹的开发利用滞后。国内只有个别企业从 20 世纪 80 年代开始开发蜜蜂幼虫产品, 但只进行简单的加工, 如将其加工成幼虫酒, 或加工成干粉装成胶囊, 作为保健品推向市场, 或将鲜蛹或干粉直接作为原料出口, 而且数量极少, 产品的技术含量和附加值低, 绝大多数幼虫和蛹的资源仍未得到有效的开发利用, 严重影响蜜蜂的产业化发展。本文对蜂蛹蛋白质的酶解工艺进行研究, 并通过动物模型对所开发的蜂蛹氨基酸口服液进行生物学功能评价, 以

* [收稿日期] 2005-12-19

[作者简介] 张海生(1965-), 男, 陕西横山人, 副教授, 博士, 主要从事功能食品研究。E-mail: hshzh1965@snnu.edu.cn

期为蜂蛹的开发利用提供依据, 促进蜜蜂的产业化发展。

1 材料与方法

1.1 材料

冷冻鲜蜂蛹: 22 日龄意大利雄蜂蛹, 购自武汉益民养蜂场。水解酶: 1398 中性蛋白酶(无锡酶制剂厂, 酶活力 $1.83 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{s})$), 木瓜蛋白酶(广州天河远天酶制剂厂, 酶活力 $2.33 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{s})$), 胃蛋白酶(惠兴生化试剂有限公司, 酶活力 $1.67 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{s})$)。

冷冻鲜蜂蛹→匀浆→酶解→灭酶→迅速冷却→过滤→硅藻土脱除异臭味→调配→均质→灌装→杀菌→冷却→成品。

1.3 蜂蛹氨基酸口服液对小鼠强壮作用的研究

选取健康 ICR 雄性小白鼠 30 只, 分为 3 组, 每组 10 只, 分别为空白对照组、酪蛋白标准品组和蜂蛹氨基酸口服液组。各组小鼠均饲喂基础饲料, 自由摄食、自由饮水。蜂蛹氨基酸口服液组和酪蛋白标准品组小鼠每天分别腹腔灌喂蜂蛹氨基酸口服液和酪蛋白标准品液(灌喂剂量 $250 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$), 空白对照组小鼠灌喂同剂量的蒸馏水。每 4 d 称重 1 次, 并与起始体重相比求出体重增长值, 饲喂 24 d。最后 1 次灌喂 24 h 后, 摘眼球取血, 置肝素抗凝管内, 用血细胞分析仪测定白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血小板(PLD)数量及血红蛋白(HGB)浓度, 分离血清, 测定血清总蛋白(TP)和白蛋白(ALB)。动物取血后, 颈椎脱臼处死, 迅速取出心、肝、脾、脑、肾、睾丸分离脂肪并称重, 计算脏器系数。脏器系数/% = 脏器重量(g)/体重(g) × 100%。

1.4 测定方法

氨基酸的测定: 采用茚三酮比色法^[4]。

氨基酸标准液的配制: 精确称取异亮氨酸标准品 0.2005 g , 用水溶解并定容至 100 mL , 吸取此液 10 mL 于容量瓶中加水至 100 mL , 即得 $200.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 异亮氨酸标准液。

标准曲线的绘制: 精确吸取异亮氨酸标准液 $0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 \text{ mL}$ (相当于 $0, 100, 200, 300, 400, 500 \mu\text{g}$ 异亮氨酸) 分别置于 6 只 25 mL 容量瓶中, 加水补充至 40 mL , 然后加入茚三酮和磷酸盐缓冲液各 1.0 mL , 摇匀。置水浴中(90°C)加热 15 min , 取出, 迅速冷却至室温, 加水定容至刻度, 摇匀, 静置 15 min 后, 于 570 nm 波长下测定吸光度, 求得回归方程为: $A = -0.57564 + 0.08227C$ (A 为

试验动物: ICR 小白鼠, 购自西安交通大学动物实验中心, 体重 $(20 \pm 2) \text{ g}$ 。

仪器: 恒温水浴锅, 紫外可见分光光度计, 血常规分析仪。

试剂: 总蛋白(TP)测试盒、白蛋白测试盒, 南京建成生物工程研究所; 酪蛋白标准品、异亮氨酸标准品、茚三酮、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠, 均为分析纯。

1.2 工艺流程

蜂蛹蛋白质的酶解工艺流程: 冷冻鲜蜂蛹→解冻→匀浆→酶解→沸水灭酶。

蜂蛹氨基酸口服液加工工艺流程:

蜂蜜→加热→过滤

吸光值, C 为氨基酸浓度), 相关系数 $R = 0.9947$ 。

样品的测定: 过滤蜂蛹蛋白质酶解液, 残渣用水反复洗涤, 合并滤液, 定容至 100 mL , 取 1.0 mL 于 570 nm 波长下测定吸光度, 测定方法同异亮氨酸标准曲线法。

血清总蛋白(TP)的测定: 采用总蛋白测试盒。

血清白蛋白(ALB)的测定: 采用白蛋白测试盒。

1.5 数据处理

统计数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组均数间的比较用 F 检验, 组间两两对比用 t 检验, 用 DPS 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 蜂蛹蛋白质酶解工艺条件的研究

2.1.1 酶种类对蜂蛹蛋白质水解效果的影响 在自然 pH, 料液比 $1:10$ 条件下, 分别用 0.1% 的 1398 中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胃蛋白酶将蜂蛹蛋白质于 40°C 酶解 2 h , 对照不加酶, 结果见图 1。

由图 1 可知, 不同种类的蛋白酶对蜂蛹蛋白质的水解效果差异很大, 1398 中性蛋白酶的水解效果最好, 木瓜蛋白酶的水解效果最差。因此, 蜂蛹蛋白质的水解宜采用 1398 中性蛋白酶。

2.1.2 酶浓度对蜂蛹蛋白质水解效果的影响 在自然 pH, 料液比 $1:10$ 条件下, 分别采用 $0.1\%, 0.2\%, 0.3\%, 0.4\%, 0.5\%, 0.6\%, 0.7\%, 0.8\%$ 的 1398 中性蛋白酶于 40°C 酶解 2 h , 结果见图 2。由图 2 可以看出, 氨基酸的生成量随 1398 中性蛋白酶浓度的增加而增加, 当酶浓度小于 0.6% 时, 氨基酸的生成量随酶浓度的升高极显著增加($P < 0.01$), 当

酶浓度超过 0.6% 后,氨基酸生成量随酶浓度的升高有所增加,但增加幅度较小($P > 0.05$)。考虑到生

产成本,宜采用 0.6% 1398 中性蛋白酶进行水解。

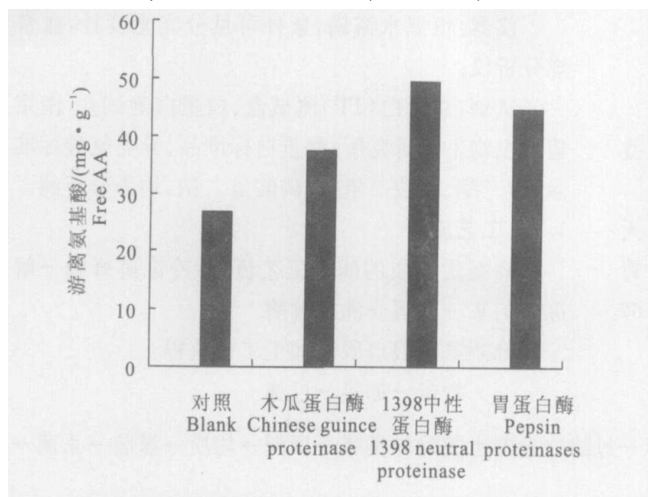


图 1 不同蛋白酶对蜂蛹蛋白质水解效果的影响

Fig 1 Effect of proteinases on honeybee pupae protein hydrolyzation

2.1.3 酶解温度对蜂蛹蛋白质水解效果的影响
在自然 pH, 料液比 1:10 条件下, 用 0.1% 的 1398 中性蛋白酶将蜂蛹蛋白质分别于 40, 50, 60, 70, 80 °C 酶解 2 h, 结果见图 3。由图 3 可知, 酶解温度对蜂蛹蛋白质水解效果的影响很大, 当温度在 60 °C 以下时, 氨基酸的生成量随温度的升高而快速增加; 温度超过 60 °C 后, 氨基酸的生成量随温度的升高急剧下降; 温度超过 70 °C 后, 氨基酸的生成量低且受酶解温度的影响不大, 表明此时蛋白酶已失活不再发生

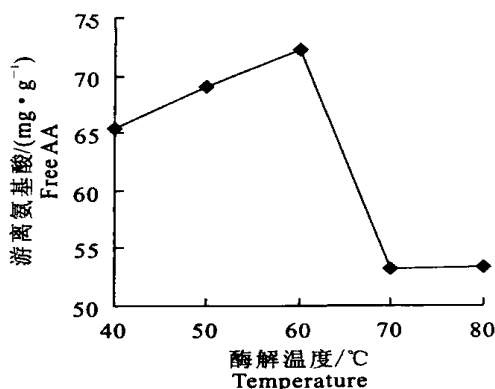


图 3 酶解温度对蜂蛹蛋白质水解效果的影响

Fig 3 Effect of temperature on honeybee pupae protein hydrolyzation

2.1.5 pH 对蜂蛹蛋白质水解效果的影响
料液比为 1:10, 用 0.1% 的 1398 中性蛋白酶分别对 pH 5.0, 6.0, 6.6, 7.0, 8.0, 9.0 的蜂蛹蛋白质于 40 °C 下水解 2 h, 结果见图 5。由图 5 可以看出, 水解液的

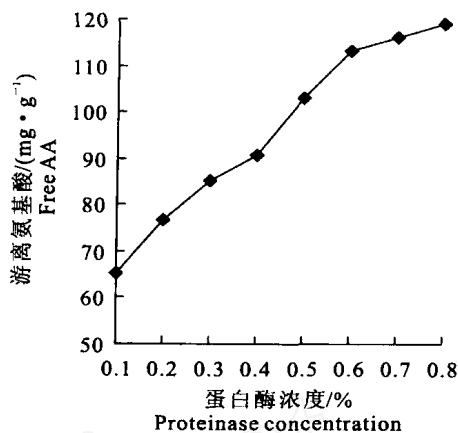


图 2 1398 中性蛋白酶浓度对蜂蛹蛋白质水解效果的影响

Fig 2 Effect of 1398 neutral proteinase on honeybee pupae protein hydrolyzation

作用。因而, 酶解温度以 60 °C 左右为宜。
2.1.4 酶解时间对蜂蛹蛋白质水解效果的影响
在自然 pH, 料液比 1:10 条件下, 用 0.1% 的 1398 中性蛋白酶于 40 °C 分别对蜂蛹蛋白质水解 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 h, 结果见图 4。从图 4 可以看出, 氨基酸生成量随酶解时间的延长而增加, 在 5 h 以内, 增加的幅度较大($P < 0.01$), 5 h 后, 氨基酸生成量虽然也有所增加, 但增加幅度较小($P > 0.05$), 考虑到生产周期和设备的利用率, 酶解时间以 5 h 为宜。

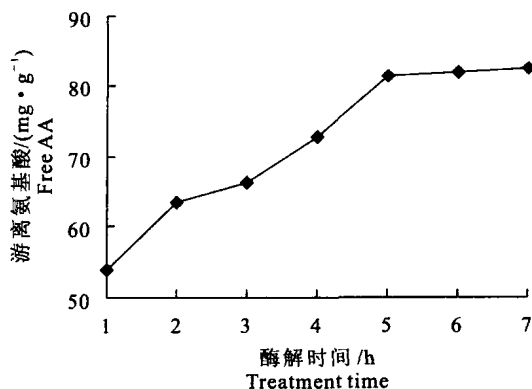


图 4 酶解时间对蜂蛹蛋白质水解效果的影响

Fig 4 Effect of treatment time on honeybee pupae protein hydrolyzation

pH 对蜂蛹蛋白质的水解影响很大, 当 pH 值低于 6.6 时, 氨基酸生成量随 pH 值的升高显著增加, pH 6.6 时达到最大, 之后随 pH 值的升高又快速下降; 当 pH 值超过 8.0 后, 氨基酸生成量又开始增加, 此

时对蜂蛹蛋白质的水解起主要作用的是水解液的碱性条件,而酶的作用较小。pH 6.6 是蜂蛹蛋白质溶液的自然 pH,因而蜂蛹蛋白质的水解以其自然 pH 为佳。

2.1.6 料液比对蜂蛹蛋白质水解效果的影响 在自然 pH 下,用 0.1% 的 1398 中性蛋白酶分别对料液比为 1:4,1:8,1:12,1:16,1:20 蜂蛹蛋白质

水溶液于 40℃水解 2 h,结果见图 6。由图 6 可知,蜂蛹蛋白质水解的最佳料液比为 1:12,当料液比在 1:12 以下时,氨基酸生成量随料液比的提高而增加,超过 1:12 后,氨基酸生成量会有所下降。料液比过低,酶不能与底物充分接触,料液比太高,单位体积内酶的有效浓度又有所降低。

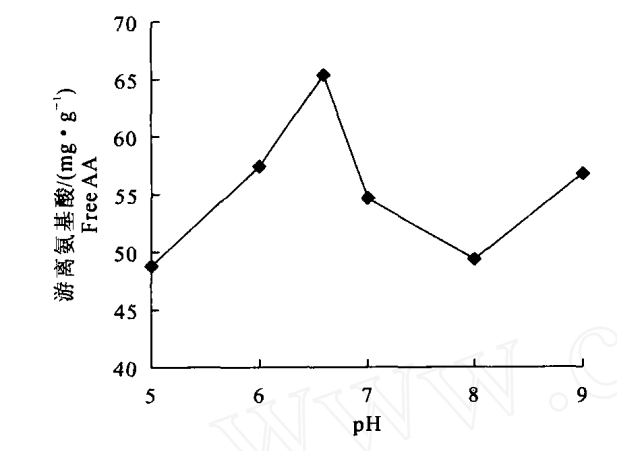


图 5 pH 对蜂蛹蛋白质水解效果的影响

Fig. 5 Effect of pH on honeybee pupae protein hydrolyzation

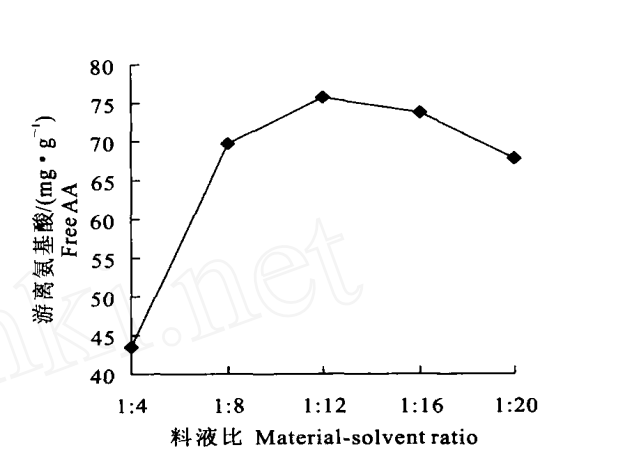


图 6 料液比对蜂蛹蛋白质水解效果的影响

Fig. 6 Effect of material-solvent ratio on honeybee pupae protein hydrolyzation

2.1.7 蜂蛹蛋白质酶解工艺条件的优选 在上述单因素试验的基础上,以酶浓度、酶解温度、酶解时间和料液比为因素,采用 L₉(3⁴) 正交试验对蜂蛹蛋

白质的酶解工艺条件进行优化。pH 为蜂蛹蛋白质水解液的自然 pH。试验水平和结果见表 2,各水平间差异显著性分析见表 3。

表 2 蜂蛹蛋白质酶解正交试验结果

Table 2 Results of honeybee pupae protein hydrolyzation by orthogonal experiment

处理号 Experiment number	酶浓度(A)/% Proteinase concentration	酶解温度(B)/℃ Temperature	酶解时间(C)/h Time	料液比(D) Material-solvent ratio	游离氨基酸生成量/ (mg · g ⁻¹) Free AA output
1	0.55(1)	50(1)	4(1)	1:10(1)	104.40
2	0.55	55(2)	5(2)	1:12(2)	124.80
3	0.55	60(3)	6(3)	1:14(3)	127.95
4	0.60(2)	50	5	1:14	150.05
5	0.60	55	6	1:10	130.90
6	0.60	60	4	1:12	140.35
7	0.65(3)	50	6	1:12	219.45
8	0.65	55	4	1:14	225.55
9	0.65	60	5	1:10	220.95
K ₁	357.15	473.90	470.30	456.25	
K ₂	421.30	481.25	495.80	484.60	
K ₃	665.95	489.25	478.30	503.55	
k ₁	119.05	157.97	156.77	152.08	
k ₂	140.43	160.42	165.27	161.53	
k ₃	221.98	163.08	159.43	167.85	
R	102.93	5.12	8.50	15.77	

表 3 蜂蛹蛋白质酶解正交试验各处理因子水平间的差异显著性 SSR 检验

Table 3 Prom inence SSR test among levels of experiment factors

水平 Level	游离氨基酸生成量 Free AA output			
	酶浓度(A) Pro teinase concentration	酶解温度(B) Temperature	酶解时间(C) Time	料液比(D) M aterial-solvent ratio
1	119.05 c	157.97 a	156.77 a	152.08 b
2	140.43 b	160.42 a	165.27 a	161.53 ab
3	221.98 a	163.08 a	159.43 a	167.85 a

注: a, b, c 表示不同水平间比较, $P < 0.05$ 。
Note: a, b, c stands for comparison among different levels, $P < 0.05$ 。

由表 2 的极差分析可知, 在蜂蛹蛋白质的水解中起主要作用的是酶浓度, 其次是料液比, 酶解温度的影响最小。各试验因素对蜂蛹蛋白质酶解作用影响的大小次序为: 酶浓度> 料液比> 酶解时间> 酶解温度。由表 3 可知, 酶浓度和料液比各水平间差异显著, 酶解温度和酶解时间各水平间差异不显著, 由此可以得出 1398 中性蛋白酶水解蜂蛹蛋白质的最佳工艺组合为 A₃B₁C₁D₃, 即 1398 中性蛋白酶浓度 0.65%, 料液比 1:14, 酶解温度 50℃, 酶解时间 4 h, 按该工艺条件进行水解, 氨基酸生成量可达 224.98 mg/g。

2.2 蜂蛹氨基酸口服液对小鼠强壮作用的研究

2.2.1 蜂蛹氨基酸口服液对小鼠体重的影响 从图 7 可以看出, 蜂蛹氨基酸口服液组和酪蛋白标品组小鼠体重增长极显著高于空白对照组 ($P < 0.01$), 蜂蛹氨基酸口服液组小鼠的体重增长显著高于酪蛋白标品组 ($P < 0.05$)。在饲喂期内空白对照组、酪蛋白标品组和蜂蛹氨基酸口服液组小鼠体重增长率分别为 33.21%、44.58% 和 49.33%。说明蜂蛹氨基酸口服液对小鼠的生长具有明显的促进作用, 且效果优于酪蛋白标准品。

2.2.2 蜂蛹氨基酸口服液对小鼠血液指标的影响 由表 4 可以看出, 蜂蛹氨基酸口服液组小鼠血液红

细胞数(RBC)和血红蛋白(HGB)浓度均极显著高于空白对照组 ($P < 0.01$), 血清总蛋白(TP)浓度显著高于空白对照组 ($P < 0.05$); 蜂蛹氨基酸口服液组小鼠血液红细胞数(RBC)和血红蛋白(HGB)浓度均显著高于酪蛋白标品组, 血小板数(PLD)极显著高于酪蛋白标品组。

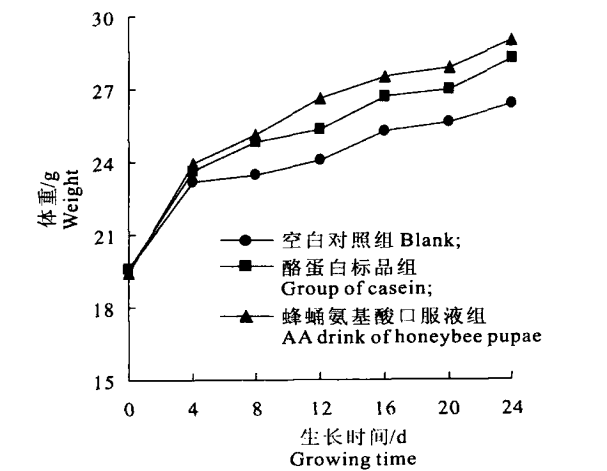


图 7 小鼠体重增长曲线

Fig. 7 Curve of mice weight increasing

表 4 蜂蛹氨基酸口服液对小鼠血常规指标的影响

Table 4 Effects of AA sdution of honeybee pupae on mice blood indexes

组别 Group	白细胞/ ($\times 10^9 L^{-1}$) WBC	红细胞/ ($\times 10^{12} L^{-1}$) RBC	血小板/ ($\times 10^9 L^{-1}$) PLD	血红蛋白/ ($g \cdot dL^{-1}$) HGB	血清总蛋白/ ($mg \cdot mL^{-1}$) TP	血清白蛋白/ ($mg \cdot mL^{-1}$) ALB
空白对照组 Blank	2.78 $\pm$ 0.12 aA	3.11 $\pm$ 0.18 aA	425 $\pm$ 0.24 aA	6.33 $\pm$ 0.29 aA	1.19 $\pm$ 0.09 aA	0.61 $\pm$ 0.08 aA
酪蛋白标品组 Group of casein	2.50 $\pm$ 0.13 bB	4.03 $\pm$ 0.20 bB	361 $\pm$ 0.19 bB	7.60 $\pm$ 0.31 bB	1.38 $\pm$ 0.10 bA	0.59 $\pm$ 0.07 aA
蜂蛹氨基酸口服液组 AA drink of honeybee pupae	2.42 $\pm$ 0.10 bB	4.42 $\pm$ 0.2 cB	423 $\pm$ 0.21 cC	8.08 $\pm$ 0.34 cB	1.40 $\pm$ 0.12 bA	0.67 $\pm$ 0.06 aA

注: A, B, C 表示同列组间比较, $P < 0.01$; a, b 表示同列组间比较, $P < 0.05$ 。下同。
Note: A, B, C $P < 0.01$, a, b $P < 0.05$, while comparing among groups

2 2 3 蜂蛹氨基酸口服液对小鼠脏器系数的影响

由表 5 可知, 蜂蛹氨基酸口服液组小鼠心脏系数显著高于空白对照组 ($P < 0.05$), 肝脏、肾脏和睾丸系数均极显著高于空白对照组 ($P < 0.01$); 蜂蛹氨

基酸口服液组小鼠肝脏系数、肾脏和睾丸系数均极显著高于酪蛋白标品组 ($P < 0.01$), 脾脏、心脏系数也显著高于酪蛋白标品组 ($P < 0.05$)。

表 5 蜂蛹氨基酸口服液对小鼠脏器系数的影响

Table 5 Effect of AA solution of honeybee pupae on viscera coefficients of mice							%
组别 Group	心脏 Heart	肝脏 Liver	脾脏 Spleen	脑 Brain	肾脏 Kidney	睾丸 Testical	
空白对照组 Blank	0.53±0.04 aA	4.77±0.17 aA	0.61±0.09 aA	1.43±0.10 aA	1.16±0.11 aA	0.57±0.06 aA	
酪蛋白标品组 Group of casein	0.58±0.05 aA	4.74±0.15 aA	0.48±0.06 bA	1.42±0.11 aA	1.29±0.12 aA	0.63±0.06 aA	
蜂蛹氨基酸口服液组 AA drink of honeybee pupae	0.62±0.06 bA	5.15±0.18 bB	0.58±0.07 aA	1.49±0.11 aA	1.47±0.10 bB	0.72±0.07 bB	

3 结论和讨论

本研究结果表明, 1398 中性蛋白酶可以对蜂蛹蛋白质进行有效水解, 其最佳酶解工艺条件为: 酶浓度 0.65%, 酶解温度 50℃, 酶解时间 4 h, 料液比 1:14, 按该工艺条件进行水解, 氨基酸生成量可达 224.98 mg/g。

蜂蛹氨基酸口服液可以有效增加小鼠体重; 显著或极显著提高小鼠血液红细胞数量、血红蛋白和血清总蛋白浓度; 提高受试小鼠的脏器系数。表明蜂蛹氨基酸口服液对幼年雄性小鼠具有很好的强壮作用。

用 1398 中性蛋白酶在水解液自然 pH 下可以对蜂蛹蛋白质进行有效水解, 且效果优于木瓜蛋白酶和胃蛋白酶, 这与郑云等^[5]用木瓜蛋白酶、碱性丝氨酸蛋白酶、中性蛋白酶和风味酶对蛋清蛋白的水解, 以及夏松养等^[6]用木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和胃蛋白酶对鲑鱼蛋白的水解结论一致。本试验中 1398 中性蛋白酶水解蜂蛹蛋白质, 游离氨基酸的得率为 51.12%, 低于张亚丽等^[7]和王遂等^[8]用中性蛋白酶

水解变性脱脂豆粕和玉米皮中蛋白质游离氨基酸得率。说明 1398 中性蛋白酶不能将全部蜂蛹蛋白质水解成游离氨基酸, 要使蜂蛹蛋白质彻底水解还需其他蛋白酶进行复合水解。

[参考文献]

[1] 张海生 蜂蛹黄酮的提取、分离和蜂蛹产品的生物学功能评价[D]. 西安: 陕西师范大学, 2005

[2] 黄 坚 开发蜂蛹产品前景广阔[J]. 中国养蜂, 2002, 53(3): 17.

[3] 陈裕光 蜂蛹蛋白能解除更年期潮热症[J]. 养蜂科技, 1999 (1): 53

[4] 黄伟坤 食品检验与分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1993

[5] 郑 云, 蔡木易, 范慰慰 蛋清白蛋白酶解工艺的研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(12): 69-71.

[6] 夏松养, 罗红宇, 罗国立, 等 酶解鲑鱼蛋白的制备[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2005, 24(3): 271-274

[7] 张亚丽, 徐 忠 中性蛋白酶提取变性脱脂豆粕中蛋白质的研究[J]. 食品研究与开发, 2002, 23(2): 26-29

[8] 王 遂, 尤 旭 微生物蛋白酶对玉米皮蛋白水解作用的研究[J]. 食品工业科技, 2000, 21(4): 22-24