식물생명공학회지 제31권 제3호
Korean J. Plant Biotechnol.
Vol. 31, No. 3, 249~253 (2004)

다양한 생물반응기 형태가 인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer) 부정근의 생장과 Ginsenoside 생산에 미치는 영향

김윤수[1], 한은주[2], 백기엽[2*]
[1]중앙대학교 인삼산업연구센터, [2]충북대학교 첨단원예기술개발연구센터

Effects of Various Bioreactors on Growth and Ginsenoside Accumulation in Ginseng Adventitious Root Cultures (*Panax ginseng* C.A. Meyer)

Yun-Soo Kim[1], Eun-Joo Hahn[2], Kee-Yoeup Paek[2*]
[1]Korea Ginseng Institute, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea
[2]Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

ABSTRACT The type of air lift bioreactor affected the root growth in ginseng adventitious root cultures. Among bioreactors used in this experiment, bulb type bubble bioreactor (BU) was the best to increase root growth (41.92 g dry weight). The kLa value representing the oxygen transfer capacity from medium to explants (6.98 h^{-1}) in BU with 5 cm bubble column was higher than other bioreactors. On the other hand, cylindric tube bioreactor (CT) without bubble column resulted in minimum root growth (38.55 g dry weight) and kLa value (5.25 h^{-1}). Furthermore, the root growth (50.30 g dry weight) in BU with 10 cm bubble column more increased than 5 cm bubble column. However, the kLa value do not affected the secondary metabolite such as ginsenosides. These results show that the bubble column in air lift bioreactor increase kLa value and increased kLa value stimulate the growth of ginseng adventitious roots.

Key words: Air lift bioreactor, bubble column bioreactor, dead zone, ginseng, volumetric oxygen transfer coefficient (kLa)

서 론

인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 한국, 중국, 일본을 포함한 동아시아의 대표적인 약용식물로 수 천년동안 위장병 치료, 혈액순환 촉진, 활력증강 등에 전통적으로 사용되어졌다. 그리고 현대의학에서는 항당뇨, 항산화, 항암 등 다양한 면역기능 증강작용에 대한 효과가 보고되고 있다 (Keum et al. 2000; Shibata 2001; Rotshteyn and Zito 2004). 이러한 약리작용의 대부분은 인삼성분 가운데 ginsenoside에 의한 것으로 보고되고 있고, ginsenoside는 지금까지 약 30여종이 분리되어 그 화학구조가 밝혀졌으며, protopanaxadiol과 protopanaxatriol로 크게 구분되어 각기 다른 약리작용을 나타내는 것으로 보고되어 있다 (Sticher 1998). 이와 같은 유용성분을 획득하기 위하여 지금까지 인삼의 재배기술과 이용방법은 꾸준히 개발되어 왔지만 여전히 인삼재배에는 많은 문제점을 갖고 있는 것이 사실이다. 인삼의 재배기간은 4~6년으로 길어 재배기간 동안 수많은 병충해에 노출되어 재배가 까다롭고, 전통적인 재배방법과 가공방법은 지속적으로 개선되지 않아 인삼 생

*Corresponding author Tel 043-261-3227 Fax 043-266-3245
E-mail paekky@chungbuk.ac.kr

산 공정의 노동집약적 특성을 탈피하지 못하였기 때문에 국내의 인삼가격은 여전히 비싼 가격에 거래되고 있다. 그 결과 고려인삼은 점점 세계인삼시장에서 경쟁력을 잃어가고 있는 추세이다.

최근 상기한 인삼재배의 문제점을 해결하기 위하여 조직배양기술에 의한 인삼 부정근 대량생산기술이 여러 연구자에 의하여 시도되었고, 일부는 성공적으로 산업화까지 진행시키고 있는 상황이다 (Kevers et al. 1999; Choi et al. 2000; Hahn et al. 2003). Hahn 등 (2003)은 indole butyric acid (IBA)와 α-naphthalene acetic acid (NAA) 같은 auxin을 이용하여 인삼 뿌리의 절편으로부터 부정근을 유도하고, 유도된 부정근에 다양한 배지와 탄소원을 처리함으로써 최적증식조건을 규명하였다. 또한 이들은 밝혀진 최적조건을 소형 공기부양식 생물반응기 (lab-scale air lift bioreactor)에 적용시킴으로써 부정근의 대량생산 가능성을 보고한 바 있다. 이와 같은 생산방법으로 인하여 ginsenoside를 얻기 위한 인삼 부정근의 배양기간은 약 40일 정도로 상당히 줄일 수 있었으며, 40일 후 부정근의 수확량은 초기 접종량의 약 20~30배를 얻을 수 있다고 보고하였다 (Kim 2002).

이상과 같이 인삼 부정근의 대량생산 기술은 크게 부정근의 유도 및 증식 기술과 생물반응기를 이용한 배양기술로 나뉘어 질 수 있다. 이들 가운데 생물반응기를 이용한 부정근의 대량배양 기술은 산업화를 위한 가장 핵심적인 부분이라 할 수 있으며, 생물반응기의 형태, 반응기내 공기의 주입방법 및 주입량과 주입공기의 조성 등이 적절히 고려되어야만 단위 면적과 시간 당 최대의 수확량을 얻을 수 있다 (Pan et al. 2000; Liu et al. 2003).

모든 호기성 세포 배양계에서 세포는 배지로부터 산소를 섭취한다. 산소가 배지를 경유하여 세포로 이동되기까지는 일반적으로 다음의 3단계에 의해서 이루어지는 것으로 알려져 있다. 첫째, 기포로부터 배양액으로의 산소의 이동이며, 그 다음으로는 산소가 용해된 배지로부터 세포로의 이동이라 할 수 있으며, 마지막으로는 세포에 의한 산소의 섭취이다 (Bartholomew et al. 1950). 이상과 같이, 호기성 세포가 생장에 필요한 산소를 섭취하기 위하여 가장 먼저 이루어져야 하는 것은 기체로부터 액체로의 산소 전달이다. 이러한 것을 나타내는 것이 기체-액체간의 물질전달 계수 (volumetric oxygen transfer coefficient: kLa)이다.

다양한 생물반응기 가운데 공기부양식 생물반응기는 반응기 전체에 걸쳐 균일한 혼합과 낮은 전단력 (shear stress), 높은 물질전달과 열전달 특성을 갖기 때문에 식물세포 및 조직배양에 적합한 것으로 알려져 있다 (Merchuk 1990). 하지만, 교반 반응기 (stirred tank reactor)에 비하여 혼합효과가 낮기 때문에 생물반응기의 형태에 따라 정체영역 (dead zone)이 생김으로써 기질의 부족현상이 일어날 수 있으며, 이러한 현상은 생산수율을 감소시키는 원인이 되기도 한다 (Ryu et al. 1994). 따라서 본 연구에서는 인삼 부정근을 대량생산할 목적으로 다양한 공기부양식 생물반응기를 고안하여 생장이 가장 우수한 반응기의 형태를 선택하고자 하였으며, 또한 각 형태의 생물반응기에서 기체-액체간의 물질전달 계수 (k_La)를 측정하여 더욱 개선된 생물반응기를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

인삼 부정근은 2,4-D 1.0 mg/L, kinetin 0.1 mg/L, sucrose 3% (w/v), gelite 0.2% (w/v)가 첨가된 MS배지 (Murashige and Skoog 1962)에 접종하여 22±1℃ 암조건에서 캘러스를 유도하고, 유도된 캘러스를 NAA 2.0 mg/L, sucrose 3% (w/v), gelite 0.2% (w/v)가 포함된 MS배지에 접종하여 동일한 배양조건에서 4주간 배양하여 유도, 증식하였다 (Kim et al. 2003). 상기한 방법에 의하여 유도된 20 g의 부정근은 증식배지 4 L가 포함된 5 L 생물반응기에서 30일간 배양하여 본 실험의 재료로 이용하였다.

공기부양식 생물반응기 (Air lift bioreactor)의 제작 및 배양

생물반응기 형태에 따른 인삼 부정근의 생장 및 ginsenoside 생산능력을 조사하기 위하여, 공기부양식 생물반응기를 채택하여 반응기의 형태를 cylindric tube bioreactor (CT), balloon type bubble bioreactor (BB), cone type bioreactor (CN), bulb type bubble bioreactor (BU)으로 각각 다르게 제작하여 실험을 실시하였다 (Table 1과 Figure 1). 또한 BU 생물반응기의 하부에 있는 bubble column의 길이를 5 cm (short length)와 10 (long length) cm로 각각 조절하여 부정근의 생장과 ginsenoside 함량에 미치는 영향을 조사하였다. 모든 배양기는 총 배양부피가 5 L로 제작되었으며, 배지는 4 L씩 첨가하여 배양을 실시하였다. 생물반응기 배양은 NH_4NO_3을 제거한 MS 기본배지 (Yu et al. 2000)에

Table 1. Dimensions and culture conditions of various air lift bioreactors in ginseng adventitous root cultures. CT, cylindric tube bioreactor; BB, balloon type bubble bioreactor; CN, cone type bioreactor; BU, bulb type bubble bioreactor.

	CT	BB	CN	BU
Inoculum size (g fresh wt./bioreactor)	20	20	20	20
Medium volume (L)	4	4	4	4
Air flow rate (vvm)	0.1	0.1	0.1	0.1
Diameter of bioreactor (cm)	18	22	22	22
Length of bioreactor (cm)	30	30	32	25
Diameter of bubble column (cm)	-	6	-	6
Length of bubble column (cm)	-	5	-	5

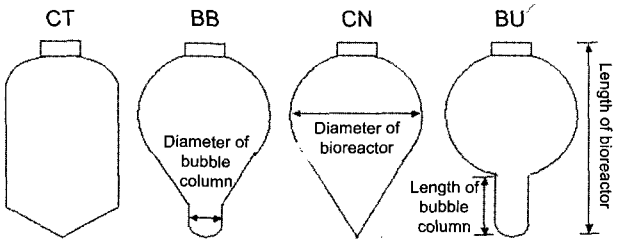

Figure 1. Diagrams of various air lift bioreactors: CT; cylindric tube bioreactor, BB; balloon type bubble bioreactor. CT, cylindric tube bioreactor; BB, balloon type bubble bioreactor; CN, cone type bioreactor; BU, bulb type bubble bioreactor.

NAA 2 mg/L와 sucrose 5% (w/v)를 첨가하여 22±1℃ 암조건에서 40일간 실시하였다. 각 생물반응기 당 20 g의 부정근을 접종하였으며 3회 반복하여 시행하였다.

Ginsenoside의 추출 및 분석

건조시킨 분말시료 1.0 g을 취하여 80℃ 온수욕조에서 80% 메탄올 50 mL로 2회 추출하여 여과, 농축 후 에틸 에테르 (ethyl ether)로 재추출하여 탈지시킨 다음, 수포화 n-부탄올로 3회 추출하여 n-부탄올층만을 모두 합하여 증류수로 1회 세척한 후 수층을 버리고 n-부탄올층만을 감압농축시켰다. 완전히 농축되어 건조된 분말을 HPLC용 메탄올 5 ml에 녹여 0.45 μm millipore syringe filter (Gelman, USA)로 여과한 후 HPLC (Waters 2690 separation module, USA)로 분석하였다 (William et al. 1996). Ginsenoside 정량은 photodiode array (Water 966, USA) 검출기로 수행하였으며, column은 Altec Platinum C18 column (1.5 μm, 33×7 mm), 용매는 acetonitrile과 물을 이용하여 처음 10분은 75:25로 후반부 15분은 63:37의 구배로 조절하였고, flow rate는 1.0 ml/min로 하여 분석하였다. 총 ginsenoside 함량은 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1 (Karl Roth, Germany)의 표준품에 의하여 검량선을 작성하고 환산하여 얻어진 각각의 *ginsenoside*를 합하여 나타내었다.

동역학적 방법에 의한 초기 k_La 측정

초기 k_La는 질소가스에 의해 탈산소화하는 동역학적 방법 (Taguchi and Humphrey 1966)에 의하여 결정하였으며 부정근이 접종되지 않은 배지상태에서 초기 k_La은 측정되었다. 어느 한 시점에서 배지내 질소를 분사하여 탈산소화 시켜 용존산소를 최소화 시킨 후, 공기를 일정한 유속으로 배지내에 재공급하여 용존산소의 농도를 증가시켰다. 초기 kLa값은 용존산소가 재공급되어 나타나는 C의 증가량 (C*-C)이 시간의 함수로 분석되었다 (Equation 1).

$$dC/dt = k_La(C^*-C) \quad (1)$$

여기서 C = 용존산소의 농도 (mol O_2/L),
C* = 포화시 용존산소의 농도 (mol O_2/L),
k_La = 초기 기체-액체간 물질전달 계수 (h^{-1})

측정시 필요한 용존산소의 농도는 dissolved oxygen (DO) sensor (O_2 sensor 12/320 T-type, Mettler Toledo, Switzerland)와 O_2 transmitter 4050 (Mettler Toledo, Switzerland)에 의하여 측정되었다.

결과 및 고찰

생물반응기 형태에 따른 부정근의 생장 및 ginsenoside 생산

일반적으로 k_La은 배양기의 형태와 배양방법, 공기주입속도, 세포의 밀도, 배지의 점도 등에 의하여 달라지는 것으로 보고되어 있다 (Kato et al. 1975; Tanaka et al. 1983; Ryu et al. 1994; Pan et al. 2000). 본 연구에서는 인삼 부정근을 배양하는데 있어서 배양기의 형태에 따라서 다르게 측정되는 k_La을 조사하고 측정된 초기 k_La값이 부정근의 생장과 이차대사산물인 ginsenoside의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Figure 1에서와 같이, 공기부양식 생물반응기의 형태를 4가지로 제작하여 초기 k_La를 측정한 결과, 원형의 상부와 하부에 5 cm의 bubble column을 가진 bulb type bubble bioreactor (BU)에서 6.98 h^{-1}로 가장 높게 측정되었고 반대로 bubble column이 없는 원통형의 cylindric tube bioreactor (CT)에서 가장 낮게 측정 (5.25 h^{-1})되었다 (Table 1과 Figure 2). 이러한 초기 k_La 측정값의 차이는 Figure 2에서 보는 것과 같이, 부정근의 생장에 영향을 준 것으로 나타났다.

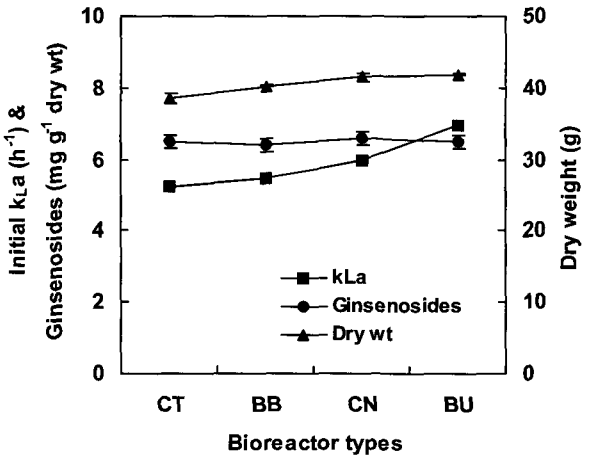

Figure 2. Comparison of initial kLa, ginsenoside accumulation and dry weight in various air lift bioreactors after 40 days of cultures. CT, cylindric tube bioreactor; BB, balloon type bubble bioreactor; CN, cone type bioreactor; BU, bulb type bubble bioreactor.

배양 40일후, 초기 k_La값이 가장 큰 BU 생물반응기에서 건물중은 41.92 g으로 가장 많이 증가하였으며 초기 k_La값과 마찬가지로 가장 낮았던 CT 생물반응기에서 건물중이 38.55 g으로 가장 낮게 나타났다. 하지만 초기 k_La값의 차이는 부정근내의 이차대사산물인 ginsenoside의 함량에는 영향을 주지 않는 것으로 보여진다. 모든 형태의 생물반응기에서 ginsenoside의 함량은 6.4~6.6 mg g^{-1} dry wt.으로 큰 차이를 나타내지는 않았다.

반면에 *Taxus chinensis*의 배양에서는 초기 k_La값의 증가는 배양세포의 생장을 증가시킬 뿐만 아니라 이차대사산물인 taxoid의 생산도 촉진시키는 것 (Zhong et al. 2002)으로 보고되고 있어, 배양세포에 따라 초기 k_La값에 대한 반응이 다소 다르게 나타나는 것을 알 수 있다. 한편, BU 생물반응기에 비하여 부정근의 생장이 조금 작게 나타난 cone type bioreactor (CN)도 생장에 대한 ginsenoside의 생산성으로 나타내었을 경우 BU와 유의적인 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다 (data not shown). 그리고 BU 생물반응기에서 a부분이 배양과정 중 정체영역 (dead zone)으로 작용하여 생장에 나쁜 영향을 줄 것으로 예상했으나, 정체현상에 따른 생장 억제 현상은 발생되지 않았다. 결과적으로 초기 k_La값의 증가는 대부분의 식물세포 및 조직에서 생장을 증가시키는 것으로 보고된 바와 같이 (Zhong et al. 1993; Pan et al. 2000), 인삼 부정근의 생장도 초기 k_La값이 증가와 더불어 증가하는 것으로 나타났다. 본 실험에서 부정근 생장에 가장 적절한 생물반응기의 형태는 bubble column이 부착된 bulb type의 생물반응기 (BU)이나 cone type 생물반응기 (CN) 역시 양호한 것으로 생각된다.

Bubble column 길이에 따른 부정근의 생장 및 ginsenoside 생산

앞서 수행한 생물반응기 형태의 결정 실험에서 부정근의 생장이 가장 양호했던 BU 생물반응기는 다른 3개의 생물반응기에 비하여 형태상 크게 차이를 나타내는 부분은 원형의 상부에 bubble column이 부착되어 있다는 것과 column이 연결되는 부분에 세포배양에서 치명적이라고 할 수 있는 정체영역이 있다는 것이다. 따라서 우리는 본 실험에서 bubble column의 길이를 기존의 생물반응기보다 2배 (10 cm) 연장시켜 부정근의 생장과 ginsenoside의 함량을 조사하였다. 또한 배양과정 중에 정체영역이 부정근의 생장에 미치는 영향에 대해서도 조사하고자 하였다.

BU 생물반응기에서 bubble column의 길이를 기존의 5 cm에서 10 cm로 연장시켰을 때, Figure 3에서 보는바와 같이 초기 k_La값이 6.52 h^{-1}에서 7.80 h^{-1}로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 k_La값의 증가는 상기한 생물반응기 형태 실험에서와 같이 인삼부정근의 생장을 42.13 g에서 50.30 g으로 약 16% 증가시킨 것으로 나타났다.

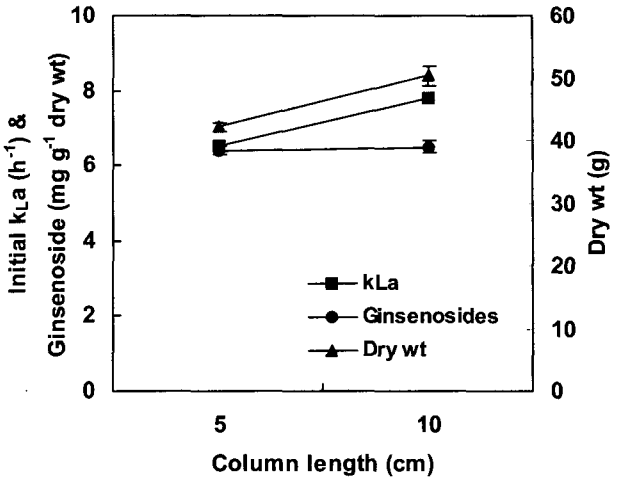

Figure 3. Comparison of initial kLa, ginsenoside accumulation and dry weight by length of column in bulb type bubble bioreactor (BU) after 40 days of cultures.

그러나 ginsenoside 함량에는 여전히 초기 k_La값의 증감이 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 이와 같은 column길이의 연장은 기체-액체간의 물질 전달에 영향을 미치는 것으로 나타났으며 이는 분사장치 (sparger)로부터 발생한 공기가 연장된 column을 통과하는 동안 큰 기포들로 되기보다는 많은 작은 기포들로 분사되어 세포들이 산소를 이용할 수 있는 계면의 면적을 증가시킨 것으로 설명할 수 있다 (Heijnen and Van't Riet 1984). 또한 BU 생물반응기에서 정체영역에 대한 생장의 억제작용은 소형 생물반응기에서는 발생하지 않은 것으로 나타났다. 하지만 이러한 정체영역은 대량배양을 위하여 생물반응기를 대규모화할 경우, 부정근의 생장이 증가하면서 하중에 의하여 침적현상이 발생하면서 문제가 될 것으로 예상된다. 본 연구소에서는 이러한 문제점을 해결하고자 1톤 규모이상의 BU 생물반응기를 제작할 때, 정체부분으로 예상되는 하부에 추가로 공기분사노즐을 설치하여 산소를 균일하게 공급함으로써 정체영역으로 인한 부정근의 생장억제현상을 방지할 수 있었다.

적 요

생물반응기의 형태에 따른 인삼부정근의 생장과 ginsenside의 생산능력에 대하여 조사한 결과, 원형의 상부와 하부에 5 cm의 bubble column을 가진 bulb type bubble bioreactor (BU)에서 건물중은 41.92 g으로 가장 많이 증가하였으며, cylindric tube bioreactor (CT)에서 건물중이 38.55 g으로 가장 낮게 나타났다. 이들 두 생물반응기의 초기 kLa값은 BU 생물반응기에서 6.98 h^{-1}로 가장 높게 측정되었고, 반대로 bubble column이 없는 CT 생물반응기에서 5.25 h^{-1}으로 가장 낮게 측정되었다. 그러나 이와 같은 초기 kLa값의 차이는 부정근내의 이차대사산물인 ginsenoside의 함량

에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 또한 BU 생물반응기에서 bubble column의 길이를 기존의 5 cm에서 10 cm로 연장시켰을 때, 초기 k_La값이 6.52 h^{-1}에서 7.80 h^{-1}로 증가하면서 인삼부정근의 생장을 42.13 g에서 50.30 g으로 약 16% 증가시킨 것으로 나타났다.

사 사

본 연구는 바이오그린 21사업과 한국학술진흥재단의 중점연구소 지원사업 (KRF-99-F0003)에 의하여 연구되었음.

인용문헌

Bartholomew WH, Karrow EO, Sfat FR, Wilhelm RH (1950) Oxygen transfer and agitation in submerged fermentations. Mass transfer of oxygen in submerged fermentations of *Streptomyces griseus*. Ind Eng Chem 42: 1801-1809

Choi SM, Son SH, Yun SR, Kwon OW, Seon JH, Paek KY (2000) Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in bioreactor system. Plant Cell Tiss Org Cult 62: 187-193

Hahn EJ, Kim YS, Yu KW, Jeong CS, Paek KY (2003) Adventitious root cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer and ginsenoside production through large-scale bioreactor system. J Plant Biotechnol 5: 1-6

Heijnen JJ, Van't Riet K (1984) Mass transfer, mixing and heat transfer phenomena in low viscosity bubble column reactors. Chem Eng J 28: B21-B42

Kato A, Shimizu Y, Nagai S (1975) Effect of initial kLa on the growth of tobacco cells in batch culture. J Ferment Technol 53: 744-751

Keum YS, Park KK, Lee JM, Chun KS, Park JH, Lee SK, Kwon H, Surh YJ (2000) Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. Cancer Lett 150: 41-48

Kim YS (2002) Production of ginsenosides through bioreactor culture fo adventitious roots in ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). Ph D. thesis. Chungbuk National University, Cheongju, Korea

Kim YS, Hahn EJ, Yeung EC, Paek KY (2003) Lateral root development and saponin accumulation as affected by IBA or NAA in adventitious root cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer. In Vitro Cell Dev Biol Plant 39: 245-249

Kevers C, Jacques Ph, Thonart Ph, Gaspar Th (1999) In vitro cultures of Panax ginseng and *P. quinquefolium*. Plant Growth Regul 27: 173-178

Liu CZ, Guo C, Wang YC, Ouyang F (2003) Comparison of various bioreactors on growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. shoot cultures. Process Biochem 39: 45-49

Merchuk JC (1990) Why use air-lift bioreactor? Trends Biotechnol 8: 66-71

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol 15: 473-497

Pan ZW, Wang HQ, Zhong JJ (2000) Scale-up study on suspension cultures of *Taxus chinensis* cells for production of taxane diterpene. Enzyme Microb Tech 27: 714-723

Ryu HW, Chang YK, Kim SD (1994) Airlift bioreactors. Korean J Biotechnol Bioeng 9: 347-364

Rotshteyn Y, Zito SW (2004) Application of modified in vitro screening procedure for identifying herbals possessing sulfonylurea-like activity. J Ethnopharmacol 93: 337-344

Shibata S (2001) Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds. J Kor Med Sci 16: 28-37

Sticher O (1998) Getting to the root of ginseng. Chemtech 28: 26-32

Taguchi H, Humphery AE (1966) Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. J Ferm Technol 44: 881-889

Tanaka H, Nishijima F, Suwa M, Iwamoto T (1983) Rotating drum fermentor for plant cell suspension cultures. Biotechnol Bioeng 25: 2359-2370

William A, John G, Hendel J (1996) Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of ginsenosides of *Panax quinquefolium*. J Chromatogr 775: 11-17

Yu KW, Hahn EJ, Paek KY (2000) Production of adventitious ginseng roots using bioreactors. Kor J Plant Tiss Cult 27: 309-315

Zhong JJ, Yoshida M, Fujiyama K, Seki T, Yoshida T (1993) Enhancement of anthocyanin production by *Perilla frutescens* cells in a stirred bioreactor with internal light irradiation. J Ferment Bioeng 75: 299-303

Zhong JJ, Pan ZW, Wang ZY, Wu J, Chen F, Takagi M, Yoshida T (2002) Effect of mixing time on taxoid production using suspension cultures of *Taxus chinensis* in a centrifugal impeller bioreactor. J Biosci Bioeng 94: 244-250

(접수일자 2004년 9월 9일, 수리일자 2004년 9월 16일)