УДК 664.86

Поступила в редакцию 14.05.25 Received 14.05.25

Т. Ю. Окунева, Н. А. Баровская, Л. М. Павловская, Н. А. Головнева

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию», г. Минск, Республика Беларусь ГНУ «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

ЧИСТЫЕ КУЛЬТУРЫ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ — ОСНОВА НАПРАВЛЕННОГО И КОНТРОЛИРУЕМОГО ПРОЦЕССА ФЕРМЕНТАЦИИ

Аннотация. Проведен комплекс исследований с разработкой технологии и ассортимента ферментированной продукции из овощей и фруктов с применением чистых культур молочнокислых бактерий, отвечающей всем нормируемым критериям качества и безопасности, принятым к ферментированным овощам и фруктам в республике.

Подобраны штаммы и составлены определенные консорциумы заквасок чистых культур молочнокислых бактерий для ферментирования овощей и фруктов, определены основные критерии, характеризующие качество ферментированной продукции, формируемые в процессе соления, квашения и мочения. Осуществлен подбор компонентного состава ферментируемой продукции.

Исследована кинетика накопления молочной кислоты в процессе брожения с применением чистых культур молочнокислых бактерий. Проведен комплекс испытаний и дана оценка безопасности типовых образцов ферментированных овощей и фруктов с применением чистых культур молочнокислых бактерий, изготовленных в условиях промышленного производства на соответствие требованиям нормативной и технической документации. Освоена и внедрена на промышленной основе предприятиями отрасли технология ферментации овощей и фруктов с использованием чистых культур молочнокислых бактерий.

Ключевые слова: овощи квашеные и соленые, фрукты моченые, консорциумы чистых культур молочнокислых бактерий

T. J. Okuneva, N. A. Barouskaya, L. M. Pavlovskaya, N. A. Golovneva

RUE «Scientific and Practical Center for Foodstuffs of the National Academy of Sciences of Belarus», Minsk, Republic of Belarus

State Scientific Institution «Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus»,
Minsk, Republic of Belarus

PURE CULTURES OF LACTIC ACID BACTERIA — THE FUNDAMENTAL BASIS OF DIRECTED AND CONTROLLED FERMENTATION PROCESS

Abstract. A set of studies was carried out with the development of technology and an assortment of fermented products from vegetables and fruits using pure cultures of lactic acid bacteria, which meets all standardized quality and safety criteria adopted for fermented vegetables and fruits in the republic.

Strains have been selected and certain consortia of starter cultures of pure cultures of lactic acid bacteria have been compiled for the fermentation of vegetables and fruits; the main criteria characterizing the quality of fermented products, formed in the process of salting, fermentation and soaking, have been determined. The selection of the component composition of fermented products was carried out.

The kinetics of lactic acid accumulation during fermentation using pure cultures of lactic acid bacteria was studied. A set of tests was carried out and the safety of standard samples of fermented vegetables and fruits using pure cultures of lactic acid bacteria produced in industrial production conditions was assessed for compliance with the requirements of regulatory and technical

documentation. The technology of fermentation of vegetables and fruits using pure cultures of lactic acid bacteria has been mastered and introduced on an industrial basis by industry enterprises.

Keywords: pickled and salted vegetables, soaked fruits, consortia of pure cultures of lactic acid bacteria.

Введение. Ферментирование овощей и фруктов относится к одним из древнейших способов переработки растительного сырья. В отличие от продуктов, сохраненных благодаря высокотемпературной стерилизации или дополнительному внесению консервирующих веществ химической или бактериальной природы, консервирующий эффект в процессе ферментации достигается путем использования естественного «жизненного цикла» специфических микроорганизмов, в основном молочнокислых бактерий. Микроорганизмы повышают свою конкурентоспособность и выживаемость путем изменения условий окружающей среды за счет продуцирования естественного продукта своей жизнедеятельности — молочной кислоты. Молочная кислота, являясь природным ингибитором, снижает опасность достижения патогенными микроорганизмами и токсинами критического уровня, подавляет их рост и размножение, повышает безопасность пищевого продукта для здоровья человека [1].

Процессы, происходящие при ферментировании, в зависимости от вида используемого сырья принято называть соление, квашение и мочение. Солению и квашению подвергают, как правило, овощные культуры (огурцы, томаты, свеклу, морковь, чеснок, капусту и другие), мочению — фрукты, в том числе ягоды (яблоки, сливы, груши, бруснику, клюкву и другие). Между квашением и солением, как методами консервирования, принципиальных различий нет, так как в том и другом случае консервантами являются молочная кислота и соль. Соль вносится как составной компонент вместе с сырьем, а молочная кислота образуется в результате сбраживания молочнокислыми бактериями сахаров, содержащихся в перерабатываемых растительных продуктах.

Для нашей республики соление и мочение, наряду с квашением, являются традиционными способами сохранения овощей и фруктов. Способ производства ферментированных продуктов можно считать относительно недорогим и энергосберегающим, не требующим наличия сложного оборудования. Ферментированную плодоовощную продукцию отличает натуральность ее состава («живой продукт»). В процессе ферментации происходит изменение органолептических и функциональных свойств пищевого продукта при сохранении полезных свойств, в том числе за счет пробиотической микрофлоры. Все эти свойства, а также относительно невысокая цена повышает восстребованность ферментированного продукта на потребительском рынке страны.

Однако на сегодняшний день в республике отсутствует практика использования чистых культур молочнокислых бактерий при производстве ферментированных овощей и фруктов, процесс идет за счет спонтанного развития эпифитной микрофлоры сырья.

Процессы ферментирования «дикой» микрофлорой практически неуправляемы и сильно зависят от многих факторов и условий среды, как технологических (концентрации соли в рассоле, температурных параметров ведения процесса, рН и других), так и от состава и концентрации нативной микрофлоры сырья [2]. Вследствие большого разнообразия эпифитной микрофлоры процесс самопроизвольного брожения принимает весьма сложный характер, так как при этом образуются продукты жизнедеятельности всех участвующих в брожении микроорганизмов и результат становится непредсказуемым, что неприемлемо для крупномасштабного производства. Между тем ведение технологического процесса в современных условиях с использованием микробных штаммов молочнокислых бактерий, в том числе подвергшихся селекции, дает возможность сознательно и рационально управлять им и заранее предвидеть результаты.

Для промышленного производства важным факторов является сортовая чистота используемого сырья, от которой во многом зависит как сам процесс ферментации, так и качество готовой продукции.

Уменьшить зависимость качества готовой продукции от выше указанных факторов, повысить управляемость процессом брожения, сократить продолжительность и повысить его «стрессоустойчивость» в различных условиях производства — задача проводимых исследований, которую представляется возможным разрешить при использовании в процессе ферментации чистых культур молочнокислых бактерий, обладающих способностью в процессе своей жизнедеятельности продуцировать необходимые вещества на определенных стадиях ферментации.

Основным условием ведения качественного процесса брожения является достаточное образование кислот в начальной фазе ферментации, так как только быстрое снижение pH раствора гарантирует от развития гнилостной микрофлоры.

76 ₹ Tom 18, № 2 (68) 2025

Молочнокислая бактериальная заквасочная культура (закваска) — это культура штаммов молочнокислых бактерий, используемая для инициирования процесса ферментации. Применение закваски в качестве стартовой культуры в процессе ферментирования является наиболее современным подходом переработки овощей и фруктов с приобретением ими требуемых специфических органолептических свойств.

Целью работы являлось проведение комплекса исследований с разработкой технологии и ассортимента ферментированной продукции из овощей и фруктов с применением заквасок чистых культур молочнокислых бактерий.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования являлись образцы ферментированной продукции из овощей и фруктов (огурцы соленые, свекла соленая целая и шинкованная, морковь соленая шинкованная, капуста квашеная шинкованная, сливы моченые, яблоки и груши моченые, брусника моченая) с использованием чистых культур молочнокислых бактерий, бактериальные консорциумы заквасок, состоящие из молочнокислых бактерий Lactobacillus paraplantarum, Lactobacillus casei, Lactobacillus buchneri, Pediococcus pentosaceus, Leuconostoc mesenteroides, дрожжей, промежуточные продукты процесса брожения, технологические операции. Органолептические, физико-химические, микробиологические показатели качества и показатели безопасности ферментированной продукции из овощей определяли методами контроля, регламентированные ГОСТ 34220 [3], ферментированной продукции из фруктов — в соответствии с требованиями, изложенными в СТБ 1190 [4], а также специфические микробиологические и органолептические методы оценки и анализа продукции, регламентированные техническими нормативными правовыми актами в области технического нормирования и стандартизации.

Результаты исследований и их обсуждение. Как показала практика, для успешного ведение процесса ферментации овощей и фруктов важен количественный и качественный состав используемого сырья, содержащего достаточное количество сахаров, аминокислот, минеральных солей и витаминов, от которых зависит жизнедеятельность микроорганизмов, в том числе и молочнокислых бактерий.

Исследования процессов ферментации на основе чистых культур молочнокислых бактерий проводились с использованием широкого спектра овощного и фруктового сырья отечественного производства, такого как огурцы, томаты, капуста белокочанная, свекла столовая, морковь, яблоки, груши, сливы и брусника. Справочные данные по содержанию основных пищевых веществ в исследуемом сырье приведены в таблице 1.

Наименование фрукта	Содержание пищевых веществ в 100 г						
	Сахара, г	Витамины, мг		Минеральные вещества, мг			Болиц в
		всего	витамин С	всего	калий	фосфор	Белки, г
Яблоки	9,1	15	10	331	278	11	0,3
Груши	10,1	10,5	5	231	155	16	0,4
Сливы	9,4	17	10	200	157	16	0,6
Брусника	7,9	17	15	150	90	16	0,5
Огурцы	1,7	6,1	4,5	224	147	24	0,4
Томаты	3,5	37	25	432	290	26	1,1
Капуста	4,6	65	60	483	300	31	1,8
Свекла	8,7	18	10	569	288	43	1,5
Морковь	6,8	29	5	435	200	55	1,3

 $T\,a\,b\,\pi\,u\,\mu\,a$ 1. Содержание основных пищевых веществ в исследуемом сырье $T\,a\,b\,l\,e$ 1. Content of main nutrients in the studied raw materials

Анализируя представленные данные, а также принимая во внимание технологичность и пригодность фруктового и овощного сырья для процесса брожения, можно сделать вывод, что свойства и особенности, проявляемые при данном виде переработке овощей и фруктов обусловлены главным образом исходным химическим составом — высоким содержанием сахаров, витаминов, минеральных веществ и белка.

Учитывая, что эпифитная микрофлора овощей и фруктов разнообразна и в процессе самопроизвольного брожения принимают участие, как молочнокислые бактерии, так и ряд других микробов — дрожжи, маслянокислые и уксуснокислые бактерии, бактерии вызывающие гниение и порчу — и, как результат: в ходе ферментации образуются продукты жизнедеятельности всей микробиоты. Создать условия для преобладания молочнокислого брожения и подавления иных процессов представляется возможным путем внесения на начальном этапе ферментации заквасок определенных штаммов чистых культур молочнокислых бактерий.

Опираясь на результаты проведенных ранее исследований по использованию чистых культур молочнокислых бактерий в процессе соления и квашения овощей [5], была выдвинута гипотеза о возможности использования для ферментации фруктов и ягод молочнокислых бактерий Lactobacillus plantarum и Lactobacillus casei, усовершенствовав их внесением штаммов других культур этой группы для формирования комплексных заквасок с определенными взаимодополняющими свойствами.

Важным аспектом в подборе микрофлоры для обеспечения активных процессов ферментирования являлось близость используемых штаммов нативной микрофлоре овощей и фруктов. Совместно со специалистами ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси» была проведена работа по отбору штаммов бактерий из рабочей коллекции молочнокислых и бифидобактерий института, выделенных из микрофлоры овощного и фруктового сырья. Основными критериями отбора являлись активность роста и кислотообразования, способность утилизировать широкий спектр углеводов, устойчивость к высоким уровням кислотности сырья и концентрациям соли, осмотолерантность, антагонизм по отношению к дрожжевым и мицелярным грибам. Важной характеристикой также являлся диапазон температур, при которых культуры способны активно размножаться.

Штаммы молочнокислых бактерий, отобранные в состав опытных образцов, выделены из растительных источников, развиваются при температуре от 4 $^{\circ}$ C до 35 $^{\circ}$ C, оптимальная температура роста составляет от 28 $^{\circ}$ C до 30 $^{\circ}$ C.

Для усиления и дополнения свойств бактерий было решено создать консорциумы, которые представляют механические смеси бактерий определенных штаммов, способных на конкретных этапах ферментации проявлять наибольшую активность, в том числе дополнять либо подавлять свойства определенных видов, таким образом, делая процесс ферментации управляемым.

При исследовании процесса ферментации фруктового сырья, в составе которого содержится значительное количество пектина и протопектина, было принято решение дополнить составы консорциумов дополнительными культурами, способными разлагать пектины до растворимой формы и активно высвобождать клеточный сок для питания других форм бактерий.

Также в состав одного консорциума ввели культуру дрожжей в целях образования летучих соединений с приятным ароматом. Культура дрожжей выделена из среды на основании ржаной муки и характеризуется активным ростом. В индивидуальном порядке для каждого используемого вида сырья были произведены расчеты по добавлению биомассы заквасок при закладке опытных партий продукции.

При расчете количества биоматериала, вносимого в качестве стартовой культуры для активации брожения исходили из активности препарата, то есть титра бактерий (количества бактерий) в 1 мл, от массы (объема) заквашиваемого продукта и от исходного предполагаемого количества бактерий в продукте (оптимальные концентрации вносимых молочнокислых бактерий $10^6-10^7~{\rm KOE/mc^3})$ [5].

В ходе ферментации поддерживали анаэробные условия, позволяющие микроорганизмам размножаться и продуцировать достаточное количество молочной кислоты, предотвращая при этом рост микроорганизмов порчи. При контакте ферментированного продукта с воздухом создаются благоприятные условия для развития плесеней из родов *Aspergillus, Oidium*, которые разлагают молочную кислоту и способствуют в дальнейшем порчу продукции в этой зоне, поэтому при солении и мочении процесс молочнокислого брожения проводили без доступа воздуха.

В контрольных образцах молочнокислое брожение проходило самопроизвольно (спонтанно) в результате деятельности молочнокислых бактерий, изначально находящихся на поверхности сырья.

Ферментацию проводили в две стадии — первая (предварительная) и вторая (окончательная). Важным фактором, определяющим качество продукции при солении и мочении, является температура и условия хранения продукции. Для каждого вида ферментируемых овощей и фруктов были установлены свои оптимальные температурные параметры брожения.

Как было отмечено ранее, определяющим фактором ферментации, характеризующим динамику и направленность процесса, является скорость накопления молочной кислоты и, как следствие, снижение уровня рН. Это наглядно видно на результатах исследований накопления молочной кислоты и изменения рН при ферментации огурцов с использованием разных заквасок молочнокислых бактерий на рисунках 1 и 2.

Как видно из рисунка 1 на вторые сутки в образцах с внесением чистых культур молочнокислых бактерий скорость накопления молочной кислоты по сравнению с контрольным образцом возросла почти в 4 раза, на третьи сутки в образцах продукции с заквасками кислотность достигла 0.6% по сравнению с 0.3% в контрольном образце.

Как видно из рисунка 2, в образцах с внесением чистых культур молочнокислых бактерий рН составило 3,8 против 5,7 в контрольном образце.

Tom 18, № 2 (68) 2025

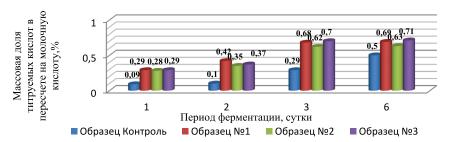


Рис. 1. Сравнительный анализ накопления молочной кислоты, накопленной при ферментации огурцов с внесением заквасок молочнокислых бактерий

Fig. 1. Comparative analysis of the accumulation of lactic acid accumulated during the fermentation of cucumbers with the addition of lactic acid bacteria

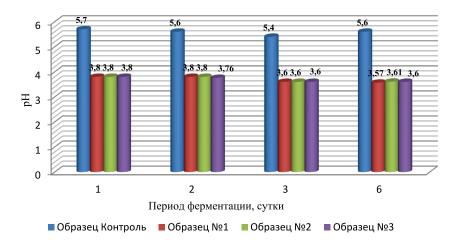


Рис. 2. Сравнительный анализ изменения pH при ферментации огурцов с внесением заквасок молочнокислых бактерий

Fig. 2. Comparative analysis of pH changes during fermentation of cucumbers with the introduction of lactic acid bacteria starters

Высокая скорость накопления молочной кислоты в образцах с заквасками в начале процесса ферментации вызвала снижение показателя рН, что обеспечило повышение кислотности, которая исключила возможность развития посторонней микрофлоры.

В контрольном образце максимальная кислотность составила 0,5 % при рН 4,89, что оказалось недостаточным и вызвало развитие в ферментированных огурцах посторонней микрофлоры с газообразованием, неравномерным изменением цвета огурцов, присутствием постороннего запаха. Данный образец продукции был утилизирован.

Результаты накопления молочной кислоты и снижения уровня рН с образцами фруктов представлены на рисунках 3 и 4.

Как показал анализ диаграмм на рисунке 3, на вторые сутки в образцах с внесением чистых культур молочнокислых бактерий скорость накопления молочной кислоты по сравнению с контрольным образцом была выше и достигла 0,3% по сравнению с 0,22 % в контрольном образце; на шестые сутки процесса ферментации в образцах с внесением чистых культур молочнокислых бактерий кислотность достигла 0,66-0,76%,а контрольный образец имел показатель по кислотности 0,65%.

Как видно из рисунка 4 уже на вторые сутки процесса ферментации в образцах с внесением чистых культур МКБ рН составило 3,26 против 3,72 в контрольном образце.

Аналогичные эксперименты были проведены и с другими видами овощного и фруктового сырья. В целях установления оптимальных технологических режимов ферментации овощей и фруктов с применением чистых культур молочнокислых культур в производственных условиях отработаны различные способы внесения бактериофогов в подготовленное сырье.

Экспериментальным путем установлено следующее.

Для более равномерного распределения закваски в толще продукта внесение целесообразнее осуществлять следующими способами:

• путем периодического опрыскивания раствором заквасок при загрузке в емкости для брожения до заливки рассолом, в случае ферментации капусты — при ведении процесса смешивания;



Рис. 3. Сравнительный анализ накопления молочной кислоты, накопленной при ферментации яблок с внесением заквасок молочнокислых бактерий Fig. 3. Comparative analysis of the accumulation of lactic acid accumulated during the fermentation of apples with the introduction of starter cultures of lactic acid bacteria



Рис. 4. Сравнительный анализ изменения рН при ферментации яблок с внесением заквасок молочнокислых бактерий

Fig. 4. Comparative analysis of pH changes during apple fermentation with the introduction of lactic acid bacteria starters

• путем внесения заквасок, разбавленных водой в приготовленный рассол или заквасочный раствор при интенсивном перемешивании.

Опыт показал, что процесс брожения огурцов начался раньше на 2 часа при внесении закваски в рассол, а капусты — на 5 часов, при добавлении консорциума на стадии смешивания. При перемешивании капусты с солью и остальными ингредиентами в смесителе наблюдалось значительное выделение сока, что также способствовало более быстрому и равномерному проникновению закваски в объем продукта.

Установлено, что при квашении свеклы в целом виде, начальные признаки активизации брожения наступили позже, чем у свеклы, ферментируемой в шинкованном виде. Через 3 часа от внесения на поверхности рассола свеклы шинкованной появились мелкие пузырьки газа, указывающие на начало процесса. Признаки брожения у свеклы, ферментированной в целом виде, наблюдались только через 6 часов от начала процесса. Набор необходимой концентрации молочной кислоты (0,6-0,8%) для свеклы квашеной в целом виде произошел на 15 сутки, для шинкованной — на 7 сутки.

Проведенные исследования позволили сделать вывод, что размер сырья играет значительную роль в процессе ферментации, и может способствовать ускорению процесса на 35-40% за счет использования измельченного овощного сырья на стадии подготовки.

Заключение. На основании проведенных исследований в республике разработана технология и усовершенствован ассортимент ферментированной продукции из овощей и фруктов с применением чистых культур молочнокислых бактерий, отвечающей всем нормируемым критериям качества и безопасности, принятым к этой группе продукции.

Проведены работы по подбору компонентного состава ферментированной продукции, на основе отечественного овощного и фруктового сырья, в том числе ягод.

Осуществлен подбор наиболее эффективных штаммов чистых культур молочнокислых бактерий, объединенных в консорциумы для максимальной концентрации и усиления их свойств. Определены оптимальные концентрации бактериофагов и способы их внесения для каждого конкретного вида сырья при ведении процесса ферментации.

Определены основные критерии, характеризующие процесс ферментации с применением чистых культур молочнокислых бактерий. Установлено, что определяющими критериями эффективности ведения процесса является скорость накопления молочной кислоты и уро-

√ 80 **√** Tom 18, № 2 (68) 2025

вень рН на первой стадии брожения: введение в ферментируемый продукт молочнокислых бактерий обуславливает чистоту процесса ферментации и минимизирует накопление побочных продуктов брожения:

- снижает на порядок уровень побочных продуктов брожения фруктов массовая доля летучих кислот составила менее 0.04%, против нормируемого показателя 0.3%;
- минимизирует спиртовое брожение: массовая доля спирта составила менее 0,005% при допустимом значении 1,3%;
- сокращает сроки ферментации на первой стадии у капусты на 25-30%, у моркови и свеклы — на 20-25%, у огурцов — на 30%.

Список использованных источников

- 1. Синха, Н. К. Настольная книга производителя и переработчика плодоовощной продукции / Под ред. Н. К. Синха, И. Г. Хью. Пер. с англ. СПб.: Профессия, 2013. С. 896.
- 2. Кондратенко В. В., Посокина Н. Е., Лялина О. Ю. Направленное ферментирование как фактор формирования стабильного качества квашеной капусты // Здоровье населения и среда обитания. 2020. № 6 (327). С. 44-49. DOI:https://doi.org/10.35627/2219-5238/2020-327-6-44-49.
- ГОСТ 34220 -2017 Овощи соленые и квашеные. Общие технические условия: Минск: БелГИСС, 2019. — С. 18.
- 4. СТБ 1190-99 Плоды и ягоды соленые, моченые, солено-маринованные, маринованные. Общие технические условия: Минск: БелГИСС, 2000. С. 12.
- 5. Павловская Л. М., Потоцкая С. В., Егорова В. З., Голубева С. Н. Совершенствование технологических процессов переработки плодов и овощей (рекомендации). Минск, 2014. С. 119.

Информация об авторах

Окунева Татьяна Юрьевна, главный специалист отдела технологий консервирования пищевых продуктов РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию» (ул. Козлова, 29, 220037, г. Минск, Республика Беларусь)

E-mail: 203sok@tut.by

Баровская Наталья Анатольевна, заведующий сектором по разработке режимов стерилизации отдела технологий консервирования пищевых продуктов РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию (ул. Козлова, 29, 220037, г. Минск, Республика Беларусь)

E-mail: 203sok@tut.by

Павловская Людмила Михайловна, начальник отдела технологий консервирования пищевых продуктов РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию» (ул. Козлова, 29, 220037, г. Минск, Республика Беларусь)

E-mail: conserve-npc@tut.by

Головнева Наталья Алексеевна, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молочнокислых и бифидобактерий ГНУ «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси», (ул. Академика Купревича, 2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь).

E-mail: golovnyova@yandex.by

The information on authors

Okuneva Tatyana Yuryevna, the chief specialist of department of technologies of conservation of foodstuff Scientific-practical center for foodstuffs of the National academy of sciences of Belarus, RUE; (29, Kozlova str., 220037, Minsk, Republic of Belarus).

E-mail: 203sok@tut.by

Barouskaya Natalia Anatolievna, managing sector on working out of modes of sterilisation of department of technologies of conservation f foodstuff Scientific-practical center for foodstuffs of the National academy of sciences of Belarus, RUE; (29, Kozlova str., 220037, Minsk, Republic of Belarus).

E-mail: 203sok@tut.by

Pavlovskaya Lyudmila Mikhailovna, head of the department of food preservation technologies of the Republican Unitary Enterprise "Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Food(29, Kozlova str., 220037, Minsk, Republic of Belarus).

E-mail: conserve-npc@tut.by

Golovneva Natalya Alekseevna, PhD (Biological), Head of the Laboratory of Lactic Acid and Bifidobacteria, State Scientific Institution "Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus" (2, Academician Kuprevich st., 220084, Minsk, Republic of Belarus).

E-mail: golovnyova@yandex.by