

Etude microbiologique des feuilles fermentées de manioc: "Ntoba Mbodi"

D. Louembé, S.C. Kobawila, Gisèle Bouanga Kalou & S. Kéléké

Keywords: Fermented Cassava leaves- Cyanogenic glucosides- Fermentation- Alkalinization- Microorganisms

Résumé

Au Congo, tant au niveau familial que petites unités artisanales, il est produit par la fermentation des feuilles de manioc du «ntoba mbodi», un plat très apprécié par son goût particulier et sa saveur.

La fermentation dure 4 jours au cours desquels les feuilles de manioc subissent des changements significatifs. En effet, après fermentation, 70% des glucosides cyanogéniques sont éliminés. Ainsi, la fermentation peut être considérée comme un procédé aussi efficace que le blanchissement ou le séchage au soleil des feuilles de manioc au cours desquels, il y a élimination de 82 à 94% des glucosides cyanogéniques.

Par ailleurs, la fermentation des feuilles de manioc conduit à une alcalinisation avec des pH autour de 8,9 contrairement à d'autres produits végétaux où la fermentation aboutit à une augmentation de l'acidité.

*Les analyses microbiologiques des feuilles fermentées de manioc révèlent, à côté des micro-organismes couramment rencontrés, la présence peu commune des *Micrococcus varians*, *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus xylosum* alors que les levures et les *Leuconostoc* sont absents.*

**Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosum* et *Erwinia spp.*, doivent jouer un rôle important lors de la fermentation des feuilles de manioc grâce à leurs enzymes polysaccharolytiques.*

Summary

Microbiological Study of «Ntoba-Mbodi», Fermented Cassava Leaves

Some families and small processing units proceed by way of fermentation of the cassava leaves to make «ntoba mbodi», a dish with a particular taste and flavor.

The fermentation process lasts 4 days and after that the product undergoes significant alteration. During fermentation, about 70% of the cyanogenic glucosides are eliminated compared to 82 to 94% by blanching, vapor cooking or sun drying. Thus fermentation can be considered as good in eliminating cyanide as these other methods.

*Contrary to other plant material whose fermentation leads to an increase in acidity, fermentation of cassava leaves leads to alkalinization, with the pH rising from 6.2 to 8.9. Microbiological analyses of the fermented cassava leaves reveal the unusual presence of *Micrococcus varians*, *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus xylosum* among the other usual microorganisms; however yeasts and *Leuconostoc* strains are not present. Among this micro-organisms, *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosum* and *Erwinia spp.* play an important role in with their polysaccharolytic enzymes.*

Introduction

Les feuilles de manioc (*Manihot esculenta* Crantz), préparées selon diverses recettes culinaires, constituent un des plats de légumes les plus consommés en alimentation humaine au Congo. Du point de vue nutritionnel, ces légumes contiennent en poids sec 17 à 34% de protéines brutes et 16 à 26% de fibres (1, 2, 3).

Du fait de la présence des glucosides cyanogéniques (linamarine et lotaustraline) dont les concentrations varient de 1000 à 2000 mg.kg⁻¹ en poids sec (1, 4), les feuilles de manioc sont toujours préalablement traitées par blanchiment ou cuisson à la vapeur pour assurer l'élimination de ces composés.

A côté de ces pratiques très classiques, les populations congolaises ont développé un autre procédé de traitement consistant en la fermentation des feuilles. Réalisé au niveau familial ou par des petites unités

artisanales, ce procédé est considéré plutôt comme un moyen de rehausser la saveur du produit diversement appelé: ntoba mubori dans la Bouenza, lilleyuku dans le Kouilou ou ntoba mbodi dans le Pool.

Comme dans la plupart de ces procédés empiriques, les fermentations se font sous l'action des micro-organismes présents fortuitement sur les feuilles, ce qui donne des produits, quoique bien prisés, d'une grande variabilité du point de vue des qualités organoleptiques et hygiéniques.

La nécessité de proposer un produit amélioré et accepté des consommateurs a suscité la présente étude qui porte sur la caractérisation des bactéries impliquées dans la fermentation des feuilles de manioc et l'évaluation de l'effet de la transformation sur l'élimination des composés cyanés.

Matériel et méthodes

1.1 Matériel végétal

Les feuilles de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) utilisées sont âgées de 2 semaines à 3 mois. Elles ont été récoltées des plantations de manioc des environs de Brazzaville.

1.2 Détermination de la nature du processus

Elle est réalisée à partir de 4 essais menés en parallèles:

- essai 1: Les feuilles de manioc détachées de leur pétiole et découpées en morceaux (2 cm de large sur 4 cm de long), sont lavées par passages successifs dans l'éthanol à 95% pendant 3 minutes et dans l'eau froide chlorée à 0,1% pendant 5 minutes pour éliminer la flore commensale. Elles sont ensuite rincées 3 fois dans de l'eau distillée stérile et emballées dans du papier aluminium stérilisé.
- essai 2: les feuilles de manioc et les feuilles de papayer servant d'emballage ne subissent aucun traitement: les feuilles de manioc détachées de leur pétiole sont découpées en morceaux, lavées et exposées au soleil pendant 2 à 3 heures à la température ambiante de 28 °C environ. Elles sont ensuite aspergées d'eau puis emballées dans des feuilles de papayer propres en raison de 150 g par paquet. Cet essai reprend le procédé artisanal de préparation. Il constitue le témoin (Figure 1).

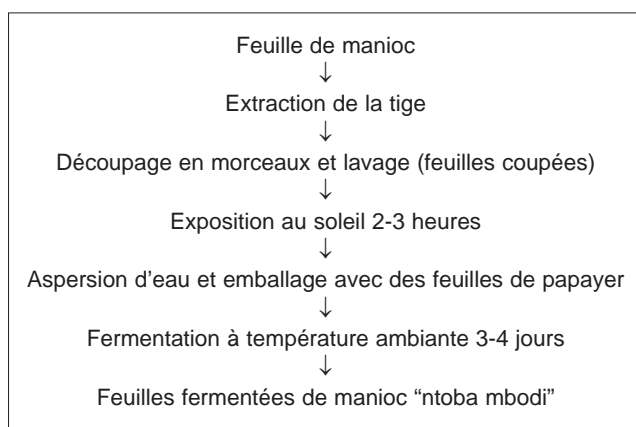


Figure 1: Diagramme de production du "ntoba mbodi".

- essai 3: les feuilles de manioc sont traitées comme dans l'échantillon 1, puis emballées dans des feuilles stérilisées de papayer (*Carica papaya*).
- essai 4: Les feuilles de manioc non traitées sont emballées dans du papier aluminium stérilisé.

Après emballage, les échantillons des différents essais, sont placés dans des marmites fermées hermétiquement. On laisse fermenter 4 jours, à température ambiante sans régulation (environ 28 °C). Les essais sont réalisés en triple.

L'évolution de l'arôme, de la couleur et de la texture du produit en cours de fermentation est évaluée toutes les 24 heures pendant 4 jours par un jury de 6 membres.

1.3 Analyses microbiologiques

Toutes les 24 heures, dix grammes de feuilles de manioc en cours de fermentation sont pesés et broyés à l'homogénéiseur Waring blender. Le broyat est mis en suspension dans 90 ml d'eau peptonée stérile. Des dilutions décimales sont préparées à partir de cette suspension mère pour l'ensemencement des milieux de culture.

1.3.1 Milieux et conditions de culture

Les milieux et conditions de culture utilisés sont les suivants: – Milieu PCA (Plate Count Agar) pour la flore mésophile totale; culture à 30 et 37 °C pendant 24 à 72 heures. – Milieu MRS gélosé à pH 5,5 pour les bactéries lactiques; ensemencement en double couche et incubation à 30 et 37 °C pendant 24 à 72 heures. – Milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar) acidifié à pH 3,5 avec de l'acide tartrique à 10% et additionné de chloramphénicol à 0,5% pour la sélection des levures et des moisissures; ensemencement en surface et incubation à 30 et 37 °C pendant 3 à 5 jours. – Milieu BP (Baird Parker) à pH 7,2 pour la sélection des staphylocoques; ensemencement en surface et incubation à 30 et 37 °C pendant 24 à 72 heures. – Milieu Agar lactosé au désoxycholate pH 7,3 pour entérobactéries pathogènes; ensemencement en double couche et incubation à 30 et 37 °C pendant 24 à 72 heures. – Milieu TSN (Trypticase Sulfite Néomycine) pH 7,2 pour la recherche des Clostridium; ensemencement en surface et incubation à 30 et 37 °C pendant 24 à 72 heures en anaérobiose. Les milieux sont ensemencés avec 0,1 ml des différentes dilutions à raison de trois boîtes de Pétri pour chaque dilution.

1.3.2 Dénombrement et identification

Les principaux genres et espèces présents sont dénombrés après culture sur milieux sélectifs. Le résultat correspond à la moyenne des nombres de colonies développées (entre 10 et 100 colonies par boîtes).

Après dénombrement des colonies, les souches sont purifiées et leurs caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques sont examinés et déterminés selon les méthodes classiques de microbiologie (5). L'identification des souches se fait sur la base des caractéristiques définies dans le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (15).

1.3.3 Isolement et identification des souches microbiennes à activités pectinolytiques et protéolytiques du ntoba-mbodi

Dix grammes de ntoba-mbodi en fin de fermentation sont prélevés, broyés et homogénéisés dans 90 ml d'eau peptonée stérile au Waring blender. Des dilutions décimales en eau peptonée sont préparées à

partir de cette suspension mère. Le milieu PCA (Plat Count Agar) est ensemencé avec 0,1 ml des différentes dilutions en raison de trois boîtes pour chaque dilution. Les boîtes sont placées à 30 °C pendant 24 à 48 heures. Après incubation, cinq colonies bien séparées et morphologiquement différentes sont choisies au hasard dans chacune des boîtes. Après isolement et purification sur milieu LPGA, les souches isolées et purifiées sont soumises aux tests protéolytique selon la méthode de liquéfaction de la gélatine décrite par Smith *et al.* (26) et pectinolytique selon la méthode décrite par Bertheau *et al.* (2), modifiée par Kéléké S. (16).

La recherche de l'activité protéolytique consiste à repiquer la souche à tester sur milieu nutritif gélifié contenant 0,4% de gélatine. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, les milieux sont recouverts du réactif de Smith. L'activité protéolytique est caractérisée par l'apparition d'une zone claire autour de la souche.

Le test pectinolytique consiste à repiquer la souche à tester sur milieu nutritif gélifié contenant 0,5% de pectine. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, les milieux de cultures sont recouverts d'une solution de cetavlon à 1%. L'activité pectinolytique se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour de la souche.

Les souches présentant les activités pectinolytique ou protéolytique sont isolées et identifiées selon la méthode classique. La capacité des isolats à utiliser les sucres a été déterminée à partir des galeries API 50CHB et API 20E (BioMérieux).

1.4 Détermination des taux de composés cyanoglucosides

Les teneurs en linamarine, cyanhydrines et cyanures libres sont déterminées suivant la méthode de Cooke (4) modifiée par Giraud *et al.* (11) pendant la fermentation et la cuisson des feuilles fermentées de manioc.

1.5 Détermination du pH et de la température

Vingt grammes de feuilles de manioc en fermentation sont broyées à l'homogénéisateur Waring blender puis mis en suspension dans 50 ml d'eau distillée stérile. Le pH est mesuré toutes les 24 heures avec un pH-mètre Jenco modèle 6071 selon les procédés décrits par Fleming *et al.* (8).

La température est déterminée à partir des paquets en fermentation à l'aide d'un thermomètre à sonde Huger model n° SA880SSX.

Résultats

2.1 Nature de la transformation

Seuls les essais 2 et 4, réalisés avec les feuilles de manioc non traitées donnent le produit attendu. En effet, au bout de 4 jours de fermentation, la couleur, la texture et la senteur des feuilles changent. Celles-ci deviennent vert sombre, se ramollissent et exhalent l'arôme caractéristique du ntoba mbodi. Les tests

d'évaluations (Tableau 1) par un jury de producteurs confirment ces résultats.

Tableau 1
Tests d'évaluation des caractéristiques physico-chimiques du "ntoba mbodi"

	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4
1 ^{er} jour	0	0	0	+
2 ^{ème} jour	0	+	0	++
3 ^{ème} jour	0	++++	0	++++
4 ^{ème} jour	0	++++	0	++++

0: Absence de senteur;
+: légère senteur caractéristique;
++: senteur assez caractéristique;
++++: senteur très caractéristique.

Le phénomène mis en jeu fait donc appel à l'action des micro-organismes présents naturellement sur les feuilles.

2.2 Evolution quantitative de la microflore

Pendant la fermentation la microflore totale s'accroît et elle est quantitativement très importante (Figure 2). Par contre, la population de bactéries lactiques n'augmente que pendant les 24 premières heures et décroît ensuite (Figure 2). Sa proportion chute considérablement de 65% à 4% par rapport à la flore totale pendant que celle de la flore non lactique passe de 34,97% au départ à 95,92% en fin de fermentation (Figure 3).

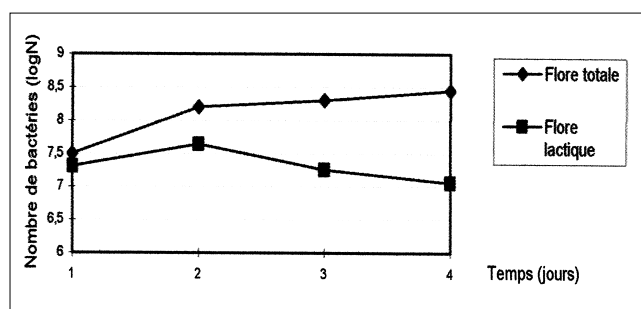


Figure 2: Evolution des microflores totale et lactique au cours de la fermentation.

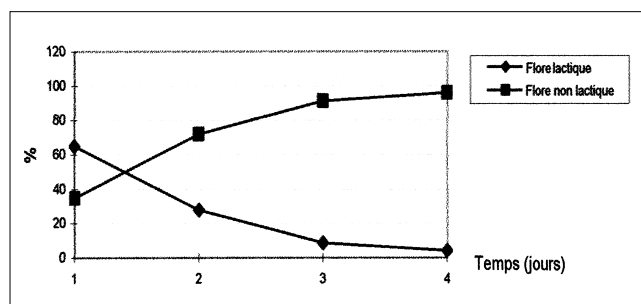


Figure 3: Evolution des microflores lactique et non lactique au cours de la fermentation.

2.3 Population microbienne

Les micro-organismes des feuilles de manioc en cours de transformation sont composés essentiellement de bactéries lactiques et non lactiques. Les bactéries non lactiques comprennent: *Acinetobacter calco aceticus*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus subtilis*; *B. cereus*; *B. macerans*; *B. amyloliquefaciens*; *B. brevis*; *B. circulans*; *B. megaterium*; *B. polymixa*; *B. pumilus*; *Erwinia* spp.; *Flavobacterium* spp.; *Micrococcus varians*; *Staphylococcus sciuri*; *S. xylosus*. Les bactéries lactiques présentes sont: *Lactobacillus plantarum*; *L. fermentum*; *Lactobacillus* spp., *Lactococcus lactis diacetylactis*; *Pediococcus cerevisiae*.

2.4 Présence de souches pectynolytiques et protéolytiques

Quatre-vingt-dix souches ont été isolées et purifiées. Parmi ces souches, 57 soit 64% sont à la fois pectinolytiques et protéolytiques et 33, soit 36% sont uniquement pectinolytiques. L'identification des souches révèle la présence de *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, *B. polymixa* ayant à la fois l'activité pectinolytique et protéolytique, et des souches de *B. brevis*, *B. circulans*, *B. marcerans*, *Bacillus* spp. dotées uniquement de l'activité pectinolytique.

2.5 Variation de la température et du pH

Au cours de la transformation, la température croît de 24 à 38,8 °C et chute ensuite à 31,2 °C en moyenne (Figure 4); le pH augmente progressivement de 6,21 à 8,89 en 4 jours (Figure 5). Les échantillons de feuilles fermentées, acquis auprès de différents ateliers de production donnent des valeurs de pH comprises entre 8,03 et 8,96 (Figure 6). La transformation des feuilles de manioc s'accompagne donc d'une alcalinisation du produit.

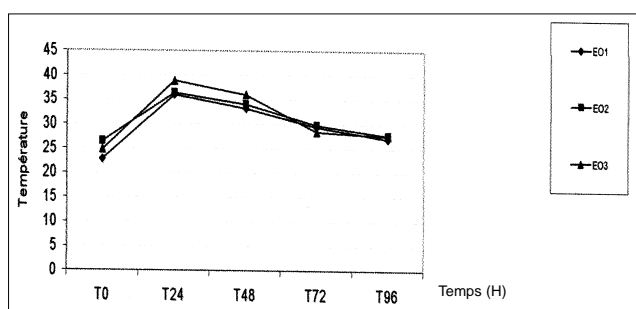


Figure 4: Evolution de la température au cours de la fermentation.

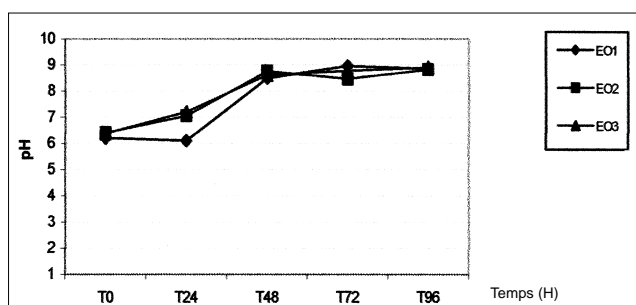


Figure 5: Evolution du pH au cours de la fermentation.

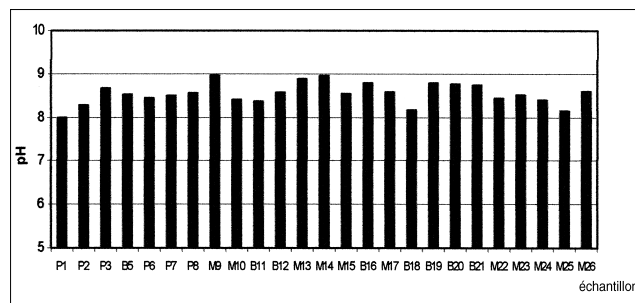


Figure 6: pH des échantillons.

2.6 Elimination des composés cyanogéniques

Les variations de la concentration de composés cyanogéniques au cours de la fermentation et de la cuisson des feuilles fermentées sont présentées à la figure 7. La teneur de ces composés passe de 1158 à 339,6 mg/kg, soit une baisse de 70,68% après 96 heures de fermentation. Ils disparaissent totalement des feuilles fermentées au bout de 10 minutes de cuisson (Figure 8).

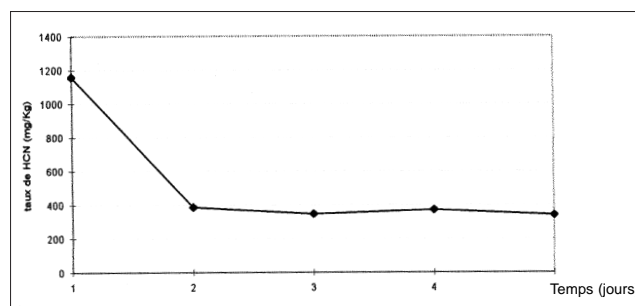


Figure 7: Variation de la teneur en acide cyanhydrique.

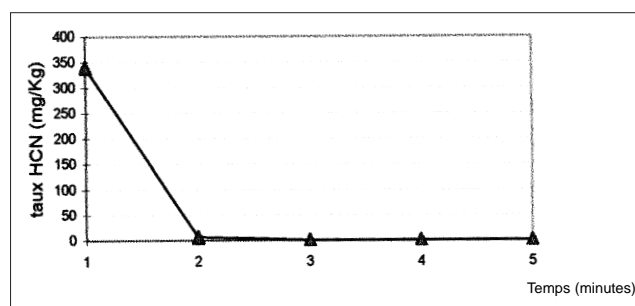


Figure 8: Variation du taux d'acide cyanhydrique.

Discussion

Le processus de transformation des feuilles de manioc est exothermique, il conduit à une augmentation de la température entre 7 et 14 °C. Ce processus est lié à l'évolution de micro-organismes naturels des feuilles fraîches, comme dans le cas d'autres produits alimentaires fermentés d'origine végétale comme le «sumbala» et le «dawadawa» (6, 27).

La microflore est quantitativement abondante et particulièrement variée. Elle comprend des micro-organismes couramment rencontrés dans les produits végétaux fermentés (6, 20) mais aussi des espèces inhabituelles telles *Micrococcus varians*, *Bacillus*

macerans, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus sciuri* et *S. xylosus* (10).

En revanche, les souches de *Leuconostoc*, particulièrement *Leuconostoc mesenteroides*, reconnues essentielles au cours de la phase initiale de la fermentation des composés d'origine végétale (13, 15), et les levures jouant un rôle important dans la fermentation des sucres résiduels sont absentes, sans nul doute à cause du pH très élevé du produit final. En effet, la production du «ntoba-mbodi» s'accompagne d'une alcalinisation importante (pH 8,89), caractéristique que l'on retrouve dans d'autres produits fermentés comme le dawadawa (pH 8,6), le ugba (pH 8,7), l'iru (pH 7,9), l'ogiri (pH 7,9), le natto (pH 8,4) (27).

Cette augmentation du pH, facteur déterminant dans la compétition microbienne, explique en outre la cinétique d'évolution de la microflore du ntoba-mbodi, laquelle diffère de celle des fermentations d'autres composés d'origine végétale. En effet, dans la fermentation des feuilles de manioc, le développement de la microflore non lactique est plus important que celui de la microflore lactique.

Effectivement avec des pH optima de croissance de 5,5 à 6,2 pour les lactobacilles, de 5,5 à 6,5 pour les pédiocoques et de 6,3 à 6,5 pour les lactocoques et leuconostoc (10, 13, 15, 19), l'aptitude des bactéries lactiques à poursuivre la croissance ne peut être qu'inhibée par le pH du milieu dont les valeurs maximales sont comprises entre 8 et 9. De ce fait, les bactéries lactiques ne paraissent pas essentielles mais, peuvent contribuer, à travers leurs métabolites, à certaines des qualités organoleptiques et nutritionnelles du produit fini.

Les micro-organismes susceptibles de jouer par contre un rôle significatif dans cette transformation, seraient essentiellement – *Bacillus macerans*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Staphylococcus xylosus* et *Erwinia* spp. Ces micro-organismes sont producteurs d'un fort arsenal d'enzymes pectinolytiques dont les pH optima d'activité, compris entre 8 et 8,50 (28), se situent dans l'intervalle des pH du milieu de fermentation des feuilles de manioc. Ces enzymes, en dégradant les pectines constituants essentiels de la lamelle moyenne des tissus, favorisent le ramollissement observé des feuilles de manioc (22, 25) et améliorent

ainsi la digestibilité de la matière organique végétale. Par ailleurs, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, *B. polymixa* seraient responsables, par leur activité très protéolytique, à l'origine de l'augmentation du pH par les ions ammonium résultant de la désamination des acides aminés libérés lors de la dégradation des protéines et peptides (27).

En comparaison aux techniques classiques de blanchiment et de cuisson à la vapeur ou au séchage au soleil qui permet d'éliminer 82 à 94% de composés cyanogéniques (12), la fermentation des feuilles de manioc peut être considérée comme un procédé efficace avec 70,68% d'élimination de ces composés.

La transformation des feuilles de manioc en «ntoba mbodi», comme la production d'autres produits fermentés dans lesquels une fermentation alcalinisante est mise en œuvre (27, 29) ne dure que 4 jours alors que la fermentation est beaucoup plus longue pour d'autres produits fermentés d'origine végétale: 14 jours environ pour les soja, betteraves, concombres, tomates; 30 jours environ pour les carottes (9); 60 à 90 voire 120 jours pour la choucroute ou le kimchi coréen (17). Au-delà de 4 jours, il se produit une altération significative du ntoba mbodi, contrairement à ce qui est observé dans les aliments fermentés d'origine végétale qui subissent une fermentation lactique acidifiante (1).

Ainsi, pour améliorer la qualité microbiologique du «ntoba mbodi» et assurer sa conservation, l'emploi de certains facteurs physico-chimiques comme le chlorure de sodium peut être envisagé. Ce facteur, en affectant la vitesse de croissance des différents micro-organismes et leur séquence d'apparition, influence la qualité du produit final. Des aliments comme la choucroute (14), les concombres et les olives en Europe, le kimchi en Corée, ont été obtenus dans ces conditions avec des concentrations en chlorure de sodium de 5 à 8% pour les concombres et les olives; 2,2 à 2,8% pour la choucroute et 3% pour le kimchi.

Les remerciements

Les auteurs remercient l'Université des Nations Unies (UNU), et l'Unesco pour le financement de cette étude.

Références bibliographiques

1. Beal C., Deschamps N., Juillard V., De Roissart H., Richard J. & Sarau B., 1994, Cinétiques de croissance et d'acidification des bactéries lactiques. *In*: Bactéries lactiques, Tome 1. H. De Roissart et Luquet F.M. (Coordonnateurs.), Loriga (Ed.), Uriage-France., 367-401.
2. Bertheau Y., Maggidi-Hervan E., Kotoujansky A., Nguyen-The C., Andro T. & Coleno A., 1984, Detection of depolymerase isoenzymes after electrophoresis electrofocusing or in titration curve. *Anal. Biochem.* 139, 383-389.
3. Collins C.H. & Lyne P.M., 1979, *Microbiological methods* (4th edn.), Butterworths (London).
4. Cooke R.D., 1978, An enzymatic assay for the total cyanide content of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J. Sc. Food Agric.* 29, 345-352.
5. Cooke R.D., De La Cruz & Elba M., 1982, The change in cyanide content of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) tissues. *J. Sci. Food Agric.* 33, 269-275.
6. EtcHELLS J.L., Fleming H.P. & Bell T.A. 1975, Factors influencing the growth of lactic acid bacteria during brine fermentation of cucumbers. *In*: Lactic acids bacteria in beverages and food (Eds Carr J.G., Cutting C. V. and Whiting G. C.), 281-305. Academic Press, New York.
7. Fleming H.P., 1982, Fermented Vegetables. *In*: Economic microbiology. Fermented foods (Ed. Rose A. H.), 227-258. New York, Academic Press.
8. Fleming H.P., McFeeters R.F., Thompson R.L. & Sanders D.C., 1983, Storage stability of vegetables fermented with pH control. *J. Food Sci.* 48, 975-981.

9. Fleming H.P., McFeeters R.F. & Thompson R. L., 1983, Test for susceptibility of fermented vegetables to secondary fermentation. *J. Food Sci.* 48, 982-983.
10. Garvie E.I., 1986, *in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 7, Eds P.H.A Sneath *et al.*; Williams et Wilkins, Baltimore, 1071-1075.
11. Giraud E., 1993, Contribution à l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* amyolytique isolée du manioc fermenté. Thèse de Biologie Cellulaire, Microbiologie, Université de Provence, Aix-Marseille I.
12. Gomez G. & Valdivieso M., 1985, Cassava foliage: chemical composition, cyanide content and effect of drying on cyanide elimination. *J. Sci. Food Agric.* 36, 433-441.
13. Hardie J.M., 1986, *in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 7, Eds P.H.A Sneath *et al.*; Williams et Wilkins, Baltimore, 1068.
14. Hubert J.C. & Dupuy P., 1994, Conservation des fruits et des légumes. *In: Bactéries lactiques*, tome II. H. de Roissart et Luquet F.M. (Coordonnateurs), Loriga (éd.), Uriage-France. 233-244.
15. Kandler O. & Weiss N., 1986, *in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, Eds P.H.A Sneath *et al.*; Williams et Wilkins, Baltimore. 1209.
16. Kéléké S., 1996, Le rouissage de manioc: contribution à l'étude du phénomène de ramollissement des racines de manioc. Thèse, 148 pages. Université de Paris XII Val de Marne.
17. Mheen T., Lee K., Chang C. & Lee S., 1983, Korean kimchi and related vegetable fermentations. *In: Handbook of indigenous fermented foods*, K.H. Steinkraus (Ed.), M. Dekker, New York, 114-118.
18. Mukherjee S.K., Chaudhuri D.R. & Gangopadhyay H., 1983, Studies on sauerkraut as a fermented food of India. *In: K.H. Steinkraus (ed.)*, Handbook of indigenous fermented foods, M. Dekker, New York, 109-114.
19. Mundt J.O., 1986, *in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 7, Eds P.H.A Sneath *et al.*; Williams et Wilkins, Baltimore, 1063-1065.
20. Pederson C.S. 1960, Sauerkraut, *in: Advances in food research*, Eds Chichester C.O., Mrak E.M. & Stewart G.F., 10, 233-291. Academic Press, New York.
21. Pederson C.S. & Albury M.N., 1983, Control of fermentation. *In: K.H. Steinkraus (ed.)*, Handbook of indigenous fermented foods, M. Dekker, New York, 102-108.
22. Peter H.A.S., 1986, Endospore-forming gram-positive rods and cocci. *In: Peter H.A.S., Nicholas S.M., Sharpe Elisabeth M., (eds) Bergey's manual of systematic Bacteriology*, volume 7, Williams et Wilkins, Baltimore, 1104-1207.
23. Rogers D.J. & Milner M., 1963, Amino acid profile of manioc leaf protein in relation to nutritive value. *Econ. Bot.* 17, 211-216.
24. Ross E. & Enriquez F.O., 1969, The nutritive value of cassava leaf meal. *Poult. Sci.* 48, 846-853.
25. Schleifer K.H., 1986, Gram-positive cocci. *In: Peter H.A.S., Nicholas S. M., Sharpe Elisabeth M., (eds) Bergey's manual of systematic Bacteriology*, vol. 7. Williams et Wilkins, Baltimore, 999-1103.
26. Smith N.R., Gordon R.E., Clark F.C., 1946, Aerobic mesophilic spore-forming bacteria. US Dept. Agr. Publi. 559.
27. Steinkraus K.H., 1984, African alkaline fermented foods and their relation to similar food in other parts of world. *In: Traditional African foods – Quality and Nutrition*, 87-91.
28. Thibault J.F., 1983, Etude structurale des substances pectines à l'aide d'une endopolygalacturonase d'*aspergillus*: Purification, propriétés et possibilités d'utilisation de cette enzyme. Thèse Doctorat d'Etat, Université de Nantes (France).
29. Wong P.P.W. & Jackson H., 1983, Chinese hum choy. *In: Handbook of indigenous fermented foods*, K.H. Steinkraus (Ed.), M. Dekker, New York, 118-119.

D. Louembé, Congolais, Docteur d'Etat Microbiologique, Professeur de Microbiologie, Université Marien Ngouabi, Congo- Brazzaville.

S.C. Kobawila, Congolais, Docteur 3^e cycle Biochimie, Maître Assistant Biochimie, Université Marien Ngouabi, Congo- Brazzaville.

Gisèle Bouanga Kalou, Congolais, Docteur 3^e cycle Biochimie Microbiologique, Maître Assistant Biochimie, Université Marien Ngouabi, Congo- Brazzaville.

S. Kéléké, Congolais, Thèse Unique Microbiologie, Chargé de Recherche Microbiologie DGRST, Congo- Brazzaville.

The opinions expressed, and the form adapted are the sole responsibility of the author(s) concerned
 Les opinions émises et la forme utilisée sont sous la seule responsabilité de leurs auteurs
 De geformuleerde stellingen en de gebruikte vorm zijn op de verantwoordelijkheid van de betrokken auteur(s)
 Las opiniones emitidas y la forma utilizada conciernen unicamente la responsabilidad de los autores