

P. tinctorum sur parcelle expérimentale.



Extraction de l'indigo (macération, oxygénation/décantation, filtration, conditionnement).

Production expérimentale d'indigo de *Polygonum tinctorium* Aiton sur le Parc du Luberon (Polygonacées)

Partie 1 : contribution à l'amélioration des connaissances scientifiques
sur la synthèse de l'indigotine et optimisation du protocole d'extraction

Philippe CHIFFOLLEAU* & Lionel GUILON**

RÉSUMÉ

S'appuyant sur une expérience séculaire et déjà utilisée dans plusieurs pays du monde, notamment en Asie, se déroule dans la région, à l'initiative de l'association « Couleur Garance » et du Parc du Luberon, une expérimentation visant à développer une production locale de pigments végétaux. L'une de ces expérimentations les plus avancées porte sur le bleu indigo à partir de la Renouée des teinturiers. Les auteurs présentent l'état des connaissances sur les processus chimiques à l'œuvre dans la fabrication de la couleur à partir de la plante, ainsi que l'état des recherches concernant les modalités d'extraction selon un protocole adapté aux conditions économiques françaises d'aujourd'hui.

Mots-clés : pigment végétal, colorant, indigo, bleu, *Polygonum tinctorium*, Renouée des teinturiers.

TITLE

Experimental production of indigo from *Polygonum tinctorium* Aiton in the Parc du Luberon (Polygonaceae).

Part 1: contribution to improved scientific understanding about the synthesis of indigo and optimization of extraction protocol

ABSTRACT

On the initiative of the association « Garance Color » and the Parc du Luberon, an experiment aimed at developing local production of plant pigments takes place in the region, from a secular experience already in use in several countries around the world particularly in Asia. One of the most advanced experiments concerns the indigo blue from the Dyer's knotweed. The authors present the state of knowledge on the chemical processes involved in the manufacture of color from the plant, and the state of research on extraction methods using a protocol adapted to the economic conditions of French today.

Keywords : *plant pigments, dye, indigo, blue, *Polygonum tinctorium*, Dyer's knotweed*

* École centrale de Paris 92, Chargé de mission agro-ressources Parc du Luberon - 0490044213 - 0674 954 559 - philippe.chiffolleau@parcduluberon.fr

** Éleve Ingénieur École supérieure d'agronomie de Montpellier.

ENJEUX

Les colorants sont aujourd'hui fabriqués à l'aide de nombreux produits chimiques et sont donc très toxiques. Cette toxicité présente non seulement un risque pour les travailleurs en contact avec les colorants, mais fait également apparaître des toxines dans les effluents industriels, ce qui met en péril les organismes vivants.

Le nouveau règlement européen REACH adopté par la commission européenne en décembre 2006 vise progressivement à supprimer les substances chimiques les plus dangereuses. Les industriels contraints à apporter la preuve de l'innocuité des substances utilisées dans leur formulation avant mise sur le marché de leurs produits, sont amenés à rechercher des substances naturelles.

C'est dans ce contexte que les colorants organiques d'origine végétale pourraient retrouver une nouvelle jeunesse. On assiste un peu partout dans le monde à un renouveau des colorants naturels pour les textiles, l'agroalimentaire et les cosmétiques. Ils offrent l'avantage d'être moins polluants que leurs homologues synthétiques et moins allergènes.

Par ailleurs, les couleurs végétales représentent une chance de développement de filières agricoles et des niches de marché dans les secteurs de la transformation et de la mise en œuvre de la couleur.

C'est sur la base des collections variétales de Couleur Garance, gestionnaire du jardin conservatoire des plantes tinctoriales à Lauris et des travaux de Michel Garcia (2012), expert en couleur végétale, que trois plantes réputées pour la qualité des couleurs obtenues ont été sélectionnées: *Polygonum tinctorium* Aiton pour le bleu, *Reseda luteola* L. (Gaude - Résédacée) pour le jaune et *Rubia tinctorum* L. (Garance - Rubiacée) pour le rouge.

Une première phase expérimentale du projet a débuté en 2012 sur des parcelles de 500 m² (Brière & Chiffolleau, 2012) puis a été poursuivie en 2013 sur 0,8 ha pour le *Polygonum*, sujet du présent article, puis à nouveau en 2014 sur 1 ha pour le *Polygonum*, 2 000 m² pour la Gaude et 500 m² pour la Garance

1. PETIT HISTORIQUE DE L'INDIGO

Couleur du ciel, de l'eau et des océans, le bleu représente pour toutes les civilisations la couleur de l'immensité, de l'infini. Il est associé au divin (la Vierge Marie toujours

vêtue de bleu), au pouvoir et à la royauté (les nobles au sang bleu), mais aussi à la classe ouvrière de par la teinte de leur uniforme dénommée « bleu de travail ».

L'indigo est une couleur remplie de mystères et il n'est pas toujours facile de le différencier du bleu ou du violet. Le mot « indigo » dérive du latin « *indicum* », qui signifie « de l'Inde » ou tout simplement « indien ». C'est avec la découverte de ce pigment provenant de l'Inde par Marco Polo (en 1299) que les Européens l'appelleront « indigo ». Le pastel était jusqu'alors cultivé pour obtenir, laborieusement, un pigment similaire mais avec une qualité médiocre et un prix élevé contrairement à l'indigo des Indes. Le récit de Marco Polo a donc poussé les européens à partir à la conquête des Indes et plus particulièrement les anglais, français, espagnols, portugais et néerlandais. L'arrivée de l'indigo sur le marché européen a donc contraint le pays de cocagne (région de Toulouse) à abandonner la culture du Pastel (*Isatis tinctoria* L. - Brassicacée) et de son pigment bleu. Utilisé aussi bien en peinture qu'en teinture, l'indigo a joué un rôle important dans le développement du commerce mondial et dans la naissance des grands empires coloniaux. En effet, la culture de l'Indigotier des teinturiers (*Indigofera tinctoria* L. - Fabacée) a été exportée de l'Inde vers toutes les régions tropicales colonisées³ d'Asie, d'Amérique dont les Caraïbes (du Tertre, 1667). L'Angleterre avait jusqu'à la fin du XIX^e siècle un véritable monopole sur le marché européen de l'indigo à travers l'Inde, qu'elle a colonisé.

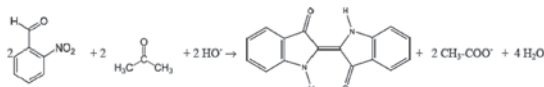
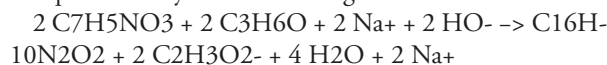
D'autres plantes étaient utilisées pour obtenir ce pigment, la meilleure pour la teinture bleue était la Persicaire à indigo (*Polygonum tinctorium*) bien connue des Chinois et des Japonais. Cependant, la réputation du pigment bleu indien a été telle qu'on appellera dorénavant « indigo » tout pigment bleu obtenu à partir d'un protocole plus ou moins complexe d'extrait de feuilles de plantes caractéristiques. L'introduction du *Polygonum tinctorium* en Europe au XIX^e siècle a permis à l'Europe de produire son propre pigment bleu d'origine végétale avec une qualité comparable au pigment « indien ». Comme toutes les nouvelles plantes possédant un intérêt pour des applications artisanales et industrielles, *P. tinctorium* a été l'objet de nombreuses études.

Ce n'est que très récemment dans l'histoire millénaire des pigments, que la science a réussi à démystifier l'origine de l'indigo dans les plantes. Morren (1839), botaniste belge du XIX^e siècle décrit avec précision *P. tinctorium*. Il identifie, au microscope, la substance colorante dans le « liquide

3. Les termes Indes orientales et Indes occidentales étaient d'ailleurs utilisés pour désigner ces régions d'Asie et d'Amérique.

intracellulaire », contrairement à son homologue français, M. Turpin (1838), qui « place cette substance dans les vésicules chlorophyllaires ». D'autres études de la même époque ont été menées dans le but de trouver la meilleure façon d'extraire l'indigo du *P. tinctorium* (Margueron, 1841). Adolf von Bayer, chimiste allemand passionné par la teinture à l'indigo, identifie, lui, l'indigotine, la molécule responsable de la couleur bleue de l'indigo. De plus il découvre en 1880 une voie de synthèse chimique de cette molécule, ce qui lui vaudra le prix Nobel de chimie en 1905. Il accorde, la même année, les droits d'exploitation du procédé à la société Allemande d'industrie chimique Badische Anilin & Soda-Fabrik (BASF).

Équation de synthèse de l'indigo



BASF ne commence à tirer profit de la découverte de Bayer que 17 ans plus tard notamment grâce aux améliorations apportées par Karl Heumann sur l'adaptation industrielle du procédé. La mise sur le marché par BASF de l'indigo synthétique fait à son tour littéralement périliciter les ventes de l'indigo indien (Reverdin, 1914). L'indigotine synthétique, aussi connue sous le nom de carmin d'indigo, référencé sous le code E132 dans la liste européenne des additifs alimentaires, est essentiellement destinée à la coloration des jeans et du textile mais aussi des aliments et des peintures. BASF détient encore aujourd'hui 40 % du marché mondial de l'indigotine soit une production d'environ 17 000 tonnes par an (Bram & Trong Anh, 2000).

La communauté scientifique reprend peu à peu le travail sur l'indigo naturel débuté des millénaires plus tôt mais avec des outils toujours plus performants. Les premiers travaux de recherche se font principalement sur *Indigofera tinctoria* (Hoogewerff & ter Meulen, 1900) et sur *Isatis tinctoria* (Beijerinck, 1900). Les chercheurs identifient respectivement l'indican et l'isatin B⁴, molécules précurseurs de l'indigotine⁵ dans chacune de ces plantes. Ce n'est qu'à la fin des années 1990 avec l'avènement de la « chimie verte » que la communauté scientifique se penche en profondeur sur le *P. tinctorium* (Minami *et al.*, 1997) et continue le travail débuté en Europe dans la première moitié du XIX^e siècle.

2. *POLYGONUM TINCTORIUM* ET L'ORIGINE DE L'INDIGO DANS LA PLANTE

2.1. *Polygonum tinctorium* ou Renouée des teinturiers

L'indigo est donc un extrait de plantes qualifiées d'indigofères. Pour toutes les plantes indigofères recensées, l'indigo ne peut s'extraire qu'à partir des feuilles (Buk-Gu, 2012). Il est possible de mettre en évidence la présence de l'indigo dans les feuilles en réalisant un « frappé sur tissu » (Fig. 1). En effet, la détérioration des feuilles se manifeste notamment par une coloration bleue.



Fig. 1 : frappé de jeunes feuilles de *P. tinctorium* sur tissu en coton.

Polygonum tinctorium ou *Persicaria tinctoria* est une plante de la famille des Polygonaceae. Il est connu sous les noms communs tels que Renouée des teinturiers ou Persicaire à indigo. Il s'agit d'une « herbe annuelle érigée de 50 à 80 cm de hauteur. Les feuilles sont ovoïdes ou elliptiques (3-8*2-4 cm). Les inflorescences, en épi, peuvent être terminales ou axillaires. La floraison a lieu de juin à septembre et la fructification d'août à septembre. Le fruit est un akène généralement ovoïde, de 2-2,5 mm de diamètre » (Brière & Chiffolleau, 2012).

4. Essentiellement retrouvé chez *Isatis tinctoria* et quasiment inexistant chez *Indigofera tinctoria* et *P. tinctorium*.

5. Il existe un isomère appelé indirubine, de couleur rouge et responsable de la teinte violacée (non bleu) de l'indigo.

2.2. L'indigotine, molécule responsable de la couleur bleue de l'indigo

Aujourd'hui toute la communauté scientifique s'accorde pour dire que l'indigotine est le résultat des réactions suivantes, présentées dans la figure 2.

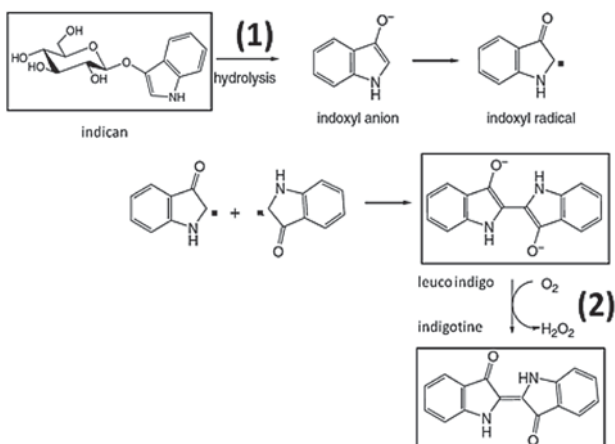


Fig. 2 : schéma de la réaction de formation de l'indigotine dans les plantes.

(1) Une hydrolyse enzymatique de l'indican par une β -glucosidase libérant un indoxyle, intermédiaire très réactif qui se dimérise spontanément pour former un leucoindigo, forme réduite de l'indigotine soluble et incolore.

(2) Une oxydation au dioxygène du leucoindigo donne l'indigotine, molécule très peu soluble dans l'eau et de couleur bleue.

2.2.1. Matériel et méthode

Quelques observations de coupes longitudinales de feuilles au microscope, ont été réalisées avec la collaboration de la PHIV du CIRAD⁶ à Montpellier. L'objectif est d'essayer de localiser l'indigo dans les cellules des feuilles du *P. tinctorium* et surtout de comprendre comment il se forme au cours du processus d'extraction (Fig. 3.)

Les feuilles récoltées la veille et conservées en chambre froide pendant 36 heures ont été mises à macérer dans une eau à 50°C. Trois feuilles ont été prélevées pour les observations microscopiques⁷ : la première était « fraîche » (A), la deuxième avait macéré une heure (B) et la troisième avait macéré 1 h 30 (C).

2.2.2. Résultats et discussion

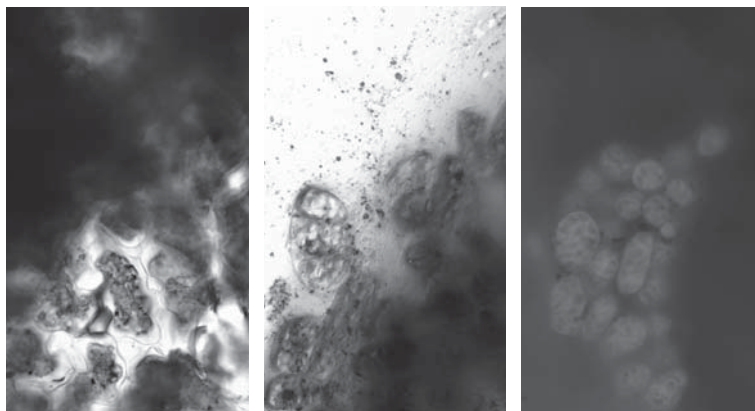
On note dans un premier temps (A) que la dégradation des tissus cellulaires de la feuille provoque l'atrophie des cellules et que leurs vacuoles semblent avoir disparu : les cellules ne sont plus en contact avec les parois cellulaires et constituent maintenant des regroupements amorphes de chloroplastes et de granules bleus : l'indigotine.

L'indigotine provient de l'oxydation du leucoindigo (cf. Fig. 2) (forme soluble et transparente de l'indigotine) par le dioxygène atmosphérique. Le leucoindigo provient lui-même de la dimérisation spontanée d'indoxyle (Maugard *et al.*, 2001). Ces indoxyles résultent de l'hydrolyse de l'indican (cf. Fig. 2), initialement stocké dans les vacuoles, par les β -glucosydases identifiées dans le stroma des chloroplastes (Minami *et al.*, 1997). Cette compartimentation semble nécessaire pour éviter cette réaction néfaste pour la

Fig. 3 : photographies de cellules du parenchyme de feuilles de *P. tinctorium*.

Quelques observations de coupes longitudinales de feuilles au microscope réalisées avec la collaboration de la PHIV du CIRAD à Montpellier. L'objectif est d'essayer de localiser l'indigo dans les cellules des feuilles du *P. tinctorium* et surtout de comprendre comment il est produit lors des étapes d'extraction (macération dans l'eau chaude des feuilles et oxygénation).

(Microscope à PHIV : Plate-forme d'histocytologie et d'imagerie cellulaire végétale - CIRAD : Centre international de la recherche agronomique et du développement).



6. Microscope à PHIV : Plate-forme d'histocytologie et d'imagerie cellulaire végétale - CIRAD : Centre international de la recherche agronomique et du développement.
 7. Au microscope à épifluorescence Leica DM6000, équipé d'un filtre de type A pour la fluorescence (excitation 340-380 nm, émission 425-800 nm).

cellule (Minami *et al.*, 2000). Il n'y a donc qu'une petite quantité d'indican qui est transformée en indigotine au sein des cellules, l'essentiel diffusant dans le cytoplasme à la suite de l'éclatement des vacuoles. On observe ces réactions au niveau de la membrane extérieure des chloroplastes. Sur l'image prise après une heure de macération (B), on observe que la cellule a une forme plus régulière. Les chloroplastes sont plus gros et les granules d'indigotine beaucoup plus nombreuses et plus dispersées dans la cellule mais surtout dans le liquide extracellulaire. Dans ce phénomène de mort cellulaire, le glucose est mobilisé pour former des granules d'amidons de plus en plus gros dans les chloroplastes. Ce glucose est issu de l'hydrolyse de l'indican par les β -glucosidases qui étaient déjà exocytées du stroma dans l'image (A). Les chloroplastes rentrent dans un processus de différenciation en amyloplastes (C) : leur contenu est libéré dans le liquide extracellulaire et ils ne synthétisent plus que de l'amidon. Cela explique l'augmentation de volume de ces anciens chloroplastes. Les enzymes continuent donc à cliver l'indican en dehors des cellules, et l'indigotine formée plus tôt s'est déjà majoritairement dispersée dans la cuve de macération.

2.2.3. Conclusion

L'indican est une des formes de stockage du glucose dans les cellules du parenchyme des feuilles de *Polygonum tinctorium*. Il est rapidement mobilisé selon les besoins de la cellule et l'indigotine résultant de son hydrolyse est évacuée en tant que déchet cellulaire. L'hydrolyse de l'indican provoque la redifférenciation des chloroplastes en amyloplastes, il faudra donc s'attendre à extraire, lors de la macération des feuilles, de nombreux pigments photosynthétiques (chlorophylles et flavonoïdes) avec l'indigotine.

3. ÉTUDE DES PERFORMANCES DE L'UNITÉ D'EXTRACTION DE L'INDIGO

Sans oublier le caractère expérimental de cette initiative, on s'engagera dans une démarche d'étude des performances de l'unité d'extraction et de la qualité du produit fini dans le but principal de justifier la viabilité du projet. En effet, l'extraction artisanale de cet indigo vise dans un premier temps à concurrencer le marché toujours détenu par l'Inde, la Chine et le Bangladesh (qui jusqu'à présent fournissait la boutique de l'association Couleur Garance en indigo). Le fait que le coût de la main-d'œuvre soit relativement bas dans ces pays par rapport au coût de la main-

d'œuvre en France, constitue pour ce projet une première barrière d'entrée sur le marché de l'indigo. Il faut donc être en mesure de proposer un produit aux coûts de production relativement bas assurant une place durable à l'« indigo de Provence » sur le marché. La compétitivité d'une filière indigo dépend, dans cette d'approche, de trois critères :

- Les capacités productives de la matière première: quel tonnage de biomasse peut-on produire?
- Les performances d'extraction de l'indigo: quel rendement en indigotine pour l'unité d'extraction?
- La qualité: quel intérêt les clients auront-ils à acheter notre produit?

Pour mener ce travail, il est important de disposer d'une base d'étude.

3.1. Matériels et méthodes

3.1.1. Détermination du protocole de référence

Il existe une multitude de méthodes pour extraire l'indigo qui varient en fonction des plantes, des peuples et de leurs traditions et surtout de leurs compréhensions du phénomène. On retrouve ainsi des méthodes de fermentations aérobies et anaérobies plus ou moins longues, variant de quelques jours à plusieurs années. Les méthodes traditionnelles d'extraction de l'indigo des plantes, notamment celle du *Polygonum tinctorium* (Ricketts, 2006) sont difficilement exploitables pour le développement d'une filière durable dans le PNR du Luberon avec le système économique de ce XXI^e siècle. Cependant à partir d'ouvrages anciens (Saint-Hilaire, 1816), des travaux des scientifiques du XIX^e siècle (Margueron, 1841) et après plusieurs années d'expérimentation, Michel Garcia est parvenu à établir un protocole d'extraction de l'indigo simple et exploitable pour ce projet, bien qu'il conclue que celui-ci ne soit pas optimisé. Ce protocole constituera donc une référence pour les propositions d'amélioration faites dans le cadre de l'étude des performances de l'unité pilote d'extraction. Il a été largement décrit dans les rapports de 2012 (Garcia, 2012a ; Brière & Chiffolleau, 2012) (Fig. 4)

Alimentation de l'unité d'extraction en matière première: récolte de la biomasse.

La vigueur du *P. tinctorium* permet d'effectuer plusieurs récoltes sur une même saison (Morren, 1839). La plantation s'étant déroulée fin avril, la première récolte était

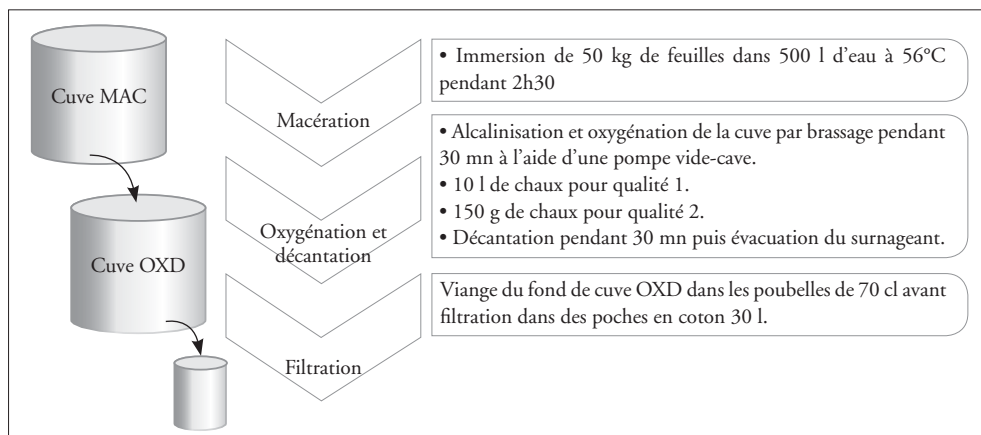


Fig. 4 : schéma du protocole de référence pour une cuve de macération.

Cuve MAC : Cuve de macération – Cuve OXD : Cuve d'oxygénation et de décantation – F : Poche de filtration.

prévue pour la deuxième quinzaine du mois de juin. Malheureusement, le printemps 2013 a été marqué par de nombreuses pluies et de faibles températures retardant ainsi le développement des cultures⁸. La première campagne d'extraction d'indigo a débuté le 2 juillet 2013 et s'est étalée sur trois semaines à raison de 4 jours par semaine jusqu'au 18 juillet. La deuxième campagne a duré 6 jours entre le 1er et le 9 août 2013.

La compréhension du phénomène de « dilution » de l'indican avec la croissance des feuilles (Minami *et al.*, 2000) mène à la conclusion que seules les jeunes feuilles ont un véritable intérêt dans la production d'indigo. Plus elles sont récoltées jeunes et plus on optimise le rapport entre le rendement en indigo et la biomasse récoltée. La récolte consiste donc à tailler les plantes pour ne prélever que les sommités des tiges sur 10 à 15 cm soit environ 1/3 de la hauteur des tiges. Ces sommités détiennent les bourgeons de feuilles et les jeunes feuilles où la teneur en indican est la plus élevée (Fig. 5).

La récolte de la biomasse était manuelle à raison d'un rendement de 50 kg/h/personne pour les deux premières récoltes, puis mécanique pour la troisième et dernière récolte. L'ensemble de la récolte est ensuite conditionné dans des sacs de 1 m³. Chaque sac est pesé jusqu'à contenir 50 kg de feuilles, ce qui correspond à la capacité d'une cuve de macération (Fig. 6).

Extraction de l'indigo

Les sacs de 50 kg sont transportés par quatre à l'unité d'extraction.

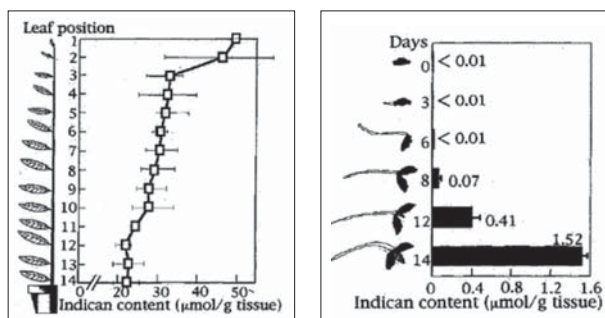


Fig. 5 : source : taux d'indican en fonction de la maturité des feuilles Minami *et al.*, 2000.



Fig. 6 : récolte mécanique du *Polygonum tinctorum*.

8. cf. partie 2 de cet article, à paraître dans le prochain numéro du Courrier scientifique du Parc naturel régional du Luberon et de la Réserve de biosphère Luberon-Lure.



Fig. 6 : pesée du *Polygonum tinctorum*.

Celle-ci permettait de traiter 600 kg de feuilles par jour grâce à :

- 1 chaudière à gasoil de marque Biemmeue modèle Thermal pour chauffer l'eau (1,5 m³/h)
- 8 cuves de 550 l: 4 pour la macération et 4 pour l'oxygénation-décantation
- 2 pompes type vide-cave, une pour transvaser le contenu d'une cuve de macération (MAC) vers une cuve d'oxygénation/décantation (OXD), l'autre pour agiter le macérat et permettre ainsi son oxygénation. Elles sont équipées de filtres retenant les particules indésirables lors du transvasement des cuves MAC vers les cuves OXD.
- une demi-douzaine de poubelles de 70 l pour récupérer le fond des cuves de décantation avant de procéder à la filtration avec des poches filtrantes en coton à 5 µm pour récupérer l'indigo sous forme de pâte, et des seaux à couvercle de 5 l pour conditionner la pâte.

Le protocole de référence a été suivi durant toute la 1^{re} campagne de production qui s'est déroulée sur 11 jours entre le 2 et le 18 juillet 2013. Une variante au niveau du chaulage a permis de diversifier la production :

- un chaulage à l'eau de chaux conduit à un indigo brut de qualité 1
- un chaulage au lait de chaux conduit à un indigo brut de qualité 2.

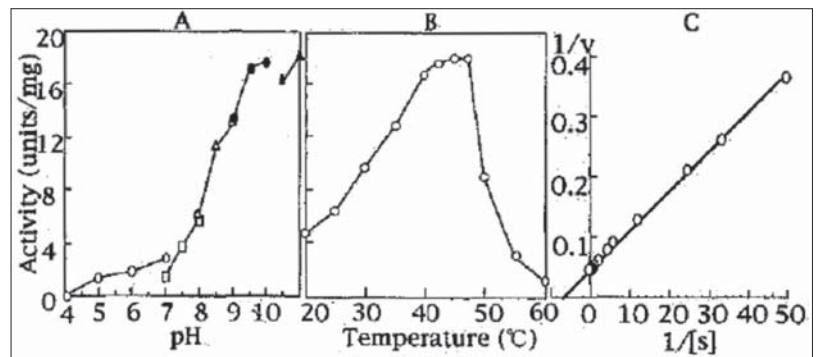
L'organisation d'une journée théorique de travail à l'unité d'extraction est décrite dans le tableau 1.

Ce protocole a permis d'extraire 96 kg d'indigo brut (dont 22 kg de qualité 1 et 74 kg de qualité 2) des 4,1 t de biomasse récoltée, et ce sur 99 heures de travail. L'objectif est donc d'améliorer les performances de l'unité d'extraction pour arriver à un protocole d'extraction de l'indigo viable économiquement avec le matériel disponible.

3.1.2. Optimisation des paramètres de performance de l'unité d'extraction

Les nombreux travaux qui ont conduit à établir le protocole de référence n'ont pas toujours abordé l'étude de l'optimisation du protocole par la réaction enzymatique à l'origine de la formation de l'indigo. Certains paramètres, qui ont pu être déterminés à la suite de travaux empiriques (Margueron, 1841), prennent tout leur sens avec les résultats des travaux de l'équipe japonaise (Minami *et al.*, 2000). On retiendra surtout de leurs travaux que la température optimale de l'activité enzymatique est d'environ 50°C, et que l'activité chute assez vite au-delà de cette température (voir Fig. 7). Connaître la cinétique de cette enzyme présente dans les feuilles a permis d'améliorer considérablement le travail d'extraction de l'indigo.

Fig. 7 : cinétique de l'indican synthase (pour l'udp-glucose) en fonction de la température et du pH (Minami *et al.*, 2000).



D'autres améliorations ont été apportées au protocole de référence. Plusieurs objectifs étaient visés :

1^{er} objectif: réduire le rapport biomasse de feuilles fraîches/ eau de la macération

La réduction du rapport de masse feuilles/eau dans la cuve de macération vise avant tout à éviter une dilution de l'enzyme et de son substrat, ce qui diminue leurs chances de se rencontrer, surtout lorsque cette réaction s'effectue en dehors des compartiments cellulaires.

2^e objectif: réduire le rapport temps/température de macération

Agir sur une gamme de temps/températures correspondant à une activité enzymatique optimale sans dégradation précoce des enzymes. Il convient de rester dans une gamme de températures comprises entre 40 et 50°C qui correspond au plateau d'activité maximale de l'enzyme. Des températures plus basses diminueraient la cinétique de la réaction, donc nécessite d'augmenter la durée de macération.

3^e objectif: optimiser la productivité du temps de travail

Par la réduction des durées des étapes de macération, d'oxygénation et de décantation sans dégradation du rendement en indigotine.

4. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

L'étude d'amélioration des performances de l'unité d'extraction a été réalisée tout au long de la première campagne de récolte-extraction. L'argumentation des trois objectifs précédents a conduit à l'achat de deux cuves supplémentaires (1 MAC et 1 OXD⁹) pour la deuxième campagne de récolte-extraction. Les objectifs ont été atteints lors de cette deuxième campagne.

1^{er} résultat : réduction du rapport de masse biomasse/ eau de macération

L'objectif est de passer d'un rapport de masse de 1 kg de biomasse pour 10 l d'eau à 1 kg pour 5 l. Ce rapport est facilement atteignable avec des micro-extractions (1 à 2 kg de feuilles). Si les cuves MAC ne permettent pas d'atteindre aisément ce résultat (tassement nécessaire), les cuves OXD permettent facilement d'immerger 75 kg de

biomasse dans 500 l d'eau : ce rapport ne semble dépendre que de la forme de la cuve de macération. Dans le cas où l'hydrolyse enzymatique de l'indican ne se ferait pas totalement dans les compartiments cellulaires, on aura quand même beaucoup d'avantages à réduire ce rapport. En effet, cela réduirait notamment de 50 % :

- les volumes d'eau à chauffer et donc
- la consommation énergétique des pompes et de la chaudière
- les coûts de main-d'œuvre pour l'unité d'extraction.

Cette première piste d'étude constitue à elle seule un grand pas dans cette démarche d'amélioration des performances de l'unité d'extraction. Bien qu'on puisse traiter 75 kg de feuilles par cuve de macération, on conditionnera la biomasse récoltée par sacs de 60 kg tout simplement pour des raisons de manutention.

2^e résultat : réduction du rapport temps/température de macération

L'objectif reste ici le même: optimiser la réaction enzymatique (1). Lorsque l'on chauffe l'eau pour initier la macération de la biomasse, on tient compte de la chute de température de 4 à 6°C. Chauffer l'eau à 50°C (au lieu de 60°C dans le protocole de référence) reviendrait donc à faire débiter une macération à environ 45°C pendant environ 2 heures. En effet, au bout de 1 h 30 de macération, il ne reste que très peu d'indigo dans les tissus foliaires. Les économies énergétiques engendrées sont non négligeables, surtout dans le cas d'un accroissement d'échelle :

- le chauffage d'une eau à 50°C plutôt qu'à 60°C permet d'économiser 4,7 MJ/m³
- le pouvoir calorifique du gasoil est estimé à 38 MJ/l
- le rendement moyen d'un moteur diesel est de 25 %.

On obtient une économie de 5 l de gasoil par m³ d'eau chauffé. Une macération à 48°C sur une durée variant de 1 h 30 à 2 heures permettrait donc d'extraire suffisamment d'indigo (biomasse bien cuite) tout en limitant la diffusion des impuretés.

Les durées d'oxygénation et de décantation ont elles aussi été améliorées. La réduction de la température de l'eau augmente la dissolution du dioxygène atmosphérique dans l'eau. L'augmentation de la surface d'échange entre l'air et l'eau contribue aussi à favoriser la dissolution du dioxygène dans l'eau. L'expérience démontre aussi que la décantation est bien plus rapide lorsque l'alcalinisation (par le lait ou

9. Cuve MAC = cuve de macération; Cuve OXD: Cuve d'oxygénation et de décantation.

l'eau de chaux) se fait une fois le macérât devenu d'un bleu dense plutôt qu'au cours de la macération, lorsque celui-ci est encore vert. La phase oxygénation-décantation passe ainsi d'une durée totale d'une heure à 30 minutes.

3^e résultat: Optimisation du temps de travail

La réduction des durées de macération, d'oxygénation et de décantation par rapport au protocole de référence améliore la productivité d'une journée de travail: traitement de 600 kg/jour de biomasse au lieu de 400 kg/jour pour le protocole de référence et journée réduite à 8 heures de travail au lieu de 9 heures. Les performances de la récolte, bien que manuelle, étaient pendant la première campagne de récolte-extraction limitées par celles de l'unité d'extraction de l'indigo. Passer d'un régime de 400 kg à 600 kg de biomasse récoltée a permis de rétablir l'équilibre entre les capacités quotidiennes d'approvisionnement en biomasse et les capacités d'extraction sans changement ni d'outils ni du nombre de cueilleurs. Cela marque aussi la limite de la récolte manuelle: 4 ouvriers agricoles dotés d'une « cisaille améliorée » peuvent difficilement récolter plus de 600 kg de biomasse par matinée alors que les essais conduits sur

la troisième récolte avec une faucheuse autochargeuse permettent de récolter le même volume en une demi-heure.

CONCLUSION

La présentation de ces travaux dans le cadre de cette première partie a permis de mieux comprendre les processus complexes de formation de l'indigotine au cours des différentes étapes d'extraction conduisant ainsi à adapter les paramètres d'exploitation de l'unité pilote.

La parfaite maîtrise du processus d'extraction permet aujourd'hui à Couleur Garance de proposer sur le marché un indigo de très grande qualité, bien supérieur à ce que l'on trouve sur le marché international.

Nous présenterons dans le prochain numéro du courrier scientifique la partie 2 sur l'optimisation des paramètres agronomiques conduits sur la culture de *Polygonum tinctorium*.

| préparation eau chaude | | | | | Pause midi | préparation eau chaude | | | | | | | | filtration | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|---------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|-------|-------|-------|
| 08:30 | 09:30 | 09:50 | 10:10 | 10:30 | | 12:00 | 12:30 | 13:00 | 13:10 | 13:20 | 13:30 | 14:00 | 15:00 | 15:30 | 16:00 | 16:30 | 17:00 |
| | M 1 | M 2 | M 3 | M 4 | | OX 1 | OX 2 | D 2 | OX 4 | D 4 | M 7 | M 8 | OX 5 | OX 6 | OX 7 | OX 8 | D 8 |
| filtration - conditionnement indigo | | | | | | | D 1 | OX 3 | D 3 | | | | | D 5 | D 6 | D 7 | |
| | | | | | | M 5 | M 6 | | | | | | | | | | |
| 3H30 | | | | | | 3H | | | | | | | | 2H30 | | | |
| M = macération (durée 2h30); OX = oxygénation (durée 30 mn), D = décantation (durée 30 mn) | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Tableau 1. organisation d'une journée de travail pour l'extraction de l'indigo selon le protocole de référence.

Bibliographie

BEIJERINCK M.-W. 1900. On Indigo-fermentation. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen*. Amsterdam, T. 2, p. 120.

BRAM G. & TRONG ANH N., 2000. L'avènement des colorants synthétiques. *Pour la Science*, n° 266, pp. 52-57.

BRIERE S. & CHIFFOLLEAU P., 2012. *Filière des colorants naturels - Mise en culture expérimentale de trois plantes pour la production de trois couleurs primaires*. Parc naturel régional du Luberon, Apt, 39 p.

BUK-GU H., 2012. Partial characterization of indigo (*Polygonum tinctorium* Ait.) plant seeds and leaves, *Industrial Crops and Products*. vol. 42, fasc.03, pp. 429-439.

DU TERTRE J.-B., 1667. *Histoire générale des Antilles habitées par les François*. T. 2, Thomas Jolly Ed., Paris, 574 p.

GARCIA M., 2012a. *Extraction et transformation de l'indigo de Persicaria tinctoria : Matériel nécessaire, conditions d'implantation, eau, énergie, cuvelage; extraction et transformation de l'indigo*. Rapport de travaux pour le compte du Parc naturel régional du Luberon, Plantes et couleurs, Lauris. 7 p.

GARCIA M., 2012b. *Trois plantes tinctoriales à cultiver en moyenne vallée de Durance*. Rapport de travaux pour le compte du Parc naturel régional du Luberon, Plantes et couleurs, Lauris. 37 p.

HOOGEWERFF S. & TER MEULEN H., 1900. Contribution to the knowledge of indican, *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen*, Amsterdam, T. 2, pp. 520-525.

MARGUERON J.-A., 1841. *Troisième rapport sur le Polygonum tinctorium, Siao-Lane des Chinois et les procédés d'extractions de l'indigo contenu dans ses feuilles*. Tours, Imprimerie de A. Mame et Cie, 32 p.

MAUGARD T., ENAUD E., CHOISY P. & LEGOY M.-D., 2001. Identification of an indigo precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (Woad). *Phytochemistry*, T. 58, n° 6, pp. 897-904.

MINAMI Y., NISHIMURA O., HARA-NISHIMURA I., NISHIMURA M., MATSUBARA H., 2000. Tissue and intracellular localization of indican and the purification and characterization of indican synthase from indigo plants. *Plant and Cell Physiology*, Vol. 38, n° 2, pp. 218-225.

MINAMI Y., TAKAO H., KANAFUJI T., MIURA K., KONDO M., HARANISHIMURA I., NISHIMURA M. & MATSUBARA H., 1997. β -Glucosidase in the Indigo Plant: Intracellular Localization and Tissue Specific Expression in Leaves. *Plant and Cell Physiology*, Vol. 38, n° 9, pp. 1069-1074.

MORREN C., 1839. *Mémoire sur la formation de l'indigo dans les feuilles du Polygonum tinctorium ou renouée tinctoriale*. Bruxelles, M. Hayez, Imprimeur de l'Académie royale, 32 p.

REVERDIN D.F., 1914. Coup d'œil général sur le développement des industries chimiques dans le canton du Valais et plus précisément sur la fabrication de l'indigo synthétique. *Bulletin de la Murithienne*. Saas-Grund (Suisse), n° 39, pp. 356-375.

RICKETTS R., 2006. *Polygonum tinctorium*: contemporary indigo farming and processing in Japan. In MEIJER L., GUYARD N., SKALTSOUNIS A.-L. & EISENBRAND G. (edi-tors), *Indirubin, the red shade of indigo*. Roscoff, Life in Progress Editions, pp. 147-156.

SAINT-HILAIRE J.-H.-J., 1816. *Mémoires sur les indigofères du Bengale et de la Chine : ou histoire et description des quelques végétaux peu connus et dont les feuilles donnent un très bel indigo*. Paris, chez l'auteur. 8 p. + 5 pl.

TURPIN M., 1838. Études microscopiques sur le gisement de la matière bleue dans les feuilles du *Polygonum tinctorium*, et sur la grande quantité de cristaux que contient le tissu cellulaire de toutes les parties de cette plante. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*. Vol. VII, pp. 806-820.