

Nouvelle méthode alcaline d'extraction de l'indigo de l'añil (*Indigofera suffruticosa*)

Elias-Jaime, MATADAMAS-ORTIZ

Universidad Autónoma Chapingo. Programa Universitario de Investigación en Agricultura Sustentable. Valorización Industrial de los Agro-recursos y Sistemas Agroindustriales Sustentables. Laboratorio de Agronomía y de los Agro-recursos. Km. 38.5 Carretera México-Texcoco C.P. 56230. Chapingo, Estado de México, México. emata993@hotmail.com.

Introduction

Depuis plusieurs années, la production de l'indigo naturel a été de plus en plus importante au niveau mondial. Cet intérêt est dû aux risques sanitaires et aux problèmes de pollution pouvant découler de l'usage des colorants synthétiques. Aujourd'hui, l'indigo naturel est produit dans plusieurs régions du monde à partir de différentes sources végétales. En Europe, c'est la guède ou pastel, *Isatis tinctoria* L., qui a été la plante à indigo exploitée pour l'extraction de ce pigment et sa production a repris récemment pour atteindre un volume d'environ 1,5 tonnes par an en France (Lambert, 2005). Au Mexique, l'indigo végétal, extrait des feuilles de l'añil ou *Indigofera suffruticosa*, est produit dans les régions d'Oaxaca et du Michoacan. La production est actuellement d'environ 400 kg par an.

Les applications industrielles des dérivés de l'indigo sont très variées, la plus courante étant la teinture des tissus, particulièrement pour la fabrication des fameux *jeans*, mais l'indigo trouve également des emplois dans l'industrie alimentaire, en bactériologie, en sciences de l'environnement, dans la filière de production d'énergie solaire et enfin, pour le traitement de maladies comme le cancer et l'Alzheimer (Hoessel et col., 1999; Leclerc et col., 2001).

Il est bien connu que l'indigo naturel est un produit de l'évolution de précurseurs incolores qui se trouvent dans les cellules des feuilles et racines de plusieurs plantes à indigo et aussi que la méthode d'extraction est conditionnée par la nature de ces molécules (Vilarem, 1999). Tandis que l'extraction à partir du pastel, *Isatis tinctoria*, a comme base une hydrolyse alcaline, celle de l'añil a été basée sur une hydrolyse enzymatique. L'approche chimique de l'élaboration de l'indigo à partir de ses précurseurs dans la plante a une grande importance pratique, pour l'obtention de rendements maximaux, associé à une haute pureté des extraits. L'analyse des conditions optimales d'extraction a pour objectif de d'obtenir des extraits de qualité, afin de gagner un plus grand marché avec des coûts de produit inférieurs à frais d'investissement égaux.

L'objet de ce travail est donc de présenter une nouvelle approche chimique pour le précurseur majoritaire dans les feuilles de l'añil, à savoir, l'indican : il s'agit d'un processus en milieu alcalin offrant des avantages à la fois sur les plans de la quantité et de la qualité par rapport à la méthode traditionnelle.

Les précurseurs des plantes à indigo

Les précurseurs de l'indigo dans les plantes sont des composés incolores que l'on trouve dans les cellules des tissus des parenchyme des feuilles ou parfois aussi des tiges et des racines, dans plusieurs familles botaniques, notamment : Leguminosae, Brassicaceae, Polygonaceae, Acanthaceae et Orchidaceae, parmi d'autres (Cardon, 2007).

Ces précurseurs ont un noyau d'indole couplé avec une molécule de sucre. Il s'agit d'un hétéroside (Figure 1).

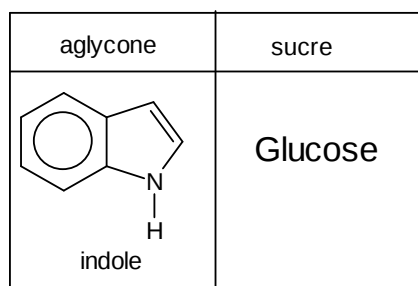


Figure 1. Structure générale des précurseurs de l'indigo végétal

Bien que la structure de base des précurseurs soit plutôt simple, ils peuvent différer entre eux, non seulement par le type de lien entre le sucre et la partie aglycone mais aussi par la forme hémiacétale du glucose. On a identifié deux types de liens entre le carbone de l'indole en position 3 et le carbone 5 du glucose. À savoir, le lien ester et le lien éther (Figure 2) :

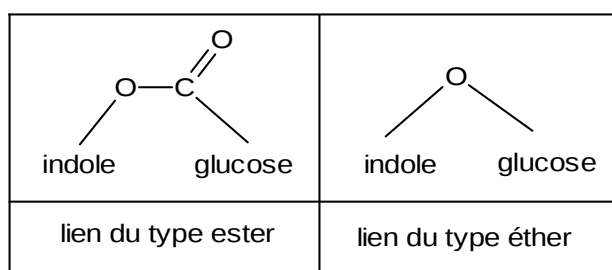


Figure 2. Types de lien entre aglycone et sucre dans les précurseurs de l'indigo

Le type de liaison des structures de base du précurseur a une grande importance dans la nature de l'hydrolyse et la libération de l'indoxyle. Alors que la liaison ester est attaquée par les acides comme par les bases, le lien éther est assez résistant à l'hydrolyse chimique et le précurseur n'est hydrolysé que par voie enzymatique. Dans ces glycosides il y a deux formes du β -D-glucose, la forme furanose et la forme pyranose (Figure 3).

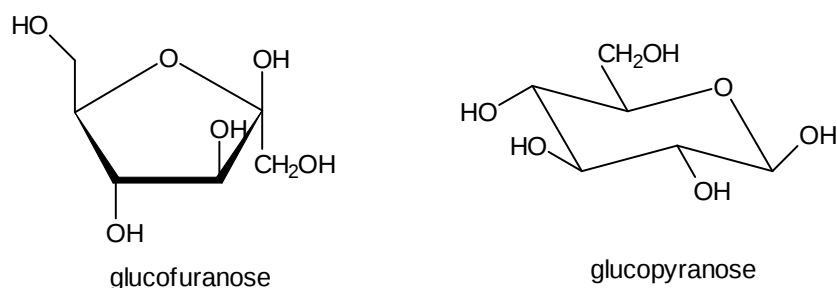


Figure 3. Les formes furanose et pyranose du glucose

En 1855, Schunck décrivit un composé qu'il considérait comme le précurseur de l'indigo dans *Isatis tinctoria*, *Polygonum tinctorium* et les espèces du genre *Indigofera*. Il le nomma **indican**. Ce chercheur nota que l'évolution de ce précurseur conduisait à l'indigo. Mais ce ne fut qu'en 1900 que Hoogerwerff et Meulen déterminèrent la structure de l'indican, et c'est alors qu'on a su qu'il s'agissait de l'**indoxyle- β -D-glucoside**, de formule structurale $C_{14}H_{17}NO_6$ (Figure 4).

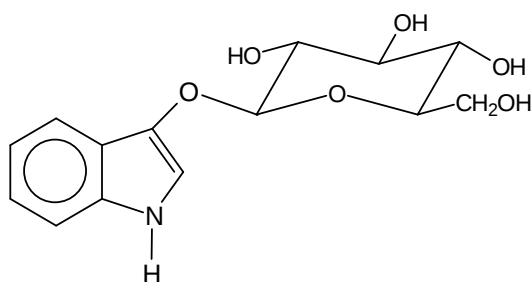


Figure 4. L'indoxyle- β -D-glucoside ou Indican

Ces auteurs remarquèrent aussi qu'il y n'avait aucune différence de réactions entre l'indican d'*Indigofera leptostachya* et celui de *Polygonum tinctorium*, donc ils conclurent qu'il s'agissait dans les deux espèces de la même molécule.

Cette même année 1900, Beijerinck publia les résultats de recherches relatives à l'étude des précurseurs de l'indigo dans *Isatis tinctoria*, *Indigofera leptostachya* et

Polygonum tinctorium et ce fut la première fois qu'il proposa l'hypothèse de l'existence de deux précurseurs différents. Pour cet auteur, *Indigofera leptostachya* et *Polygonum tinctorium* sont des « plantes à indican » et par contre, *Isatis tinctoria* est une « plante à indoxyle ». Il observe que les extraits du pastel ne produisent de l'indigo que par le traitement avec un alcali, alors que l'indicin est fortement stable à l'hydrolyse chimique. L'indicin s'est révélé être hydrolysable par des enzymes du type des glucosidases, issues de la plante-même, ou d'origine microbienne. Mais, lorsque ces enzymes furent incubées avec des extraits d'*Isatis*, il n'y eut pas de production d'indigo.

Epstein et collaborateurs (1967) isolèrent et identifièrent un précurseur présent dans *Isatis tinctoria*, comme prévu des années auparavant par Beijerinck et ils lui donnèrent le nom d'**indoxyle-5-cetogluconate** ou **isatan B**. De plus, ils établirent la structure suivante (Figure 5).

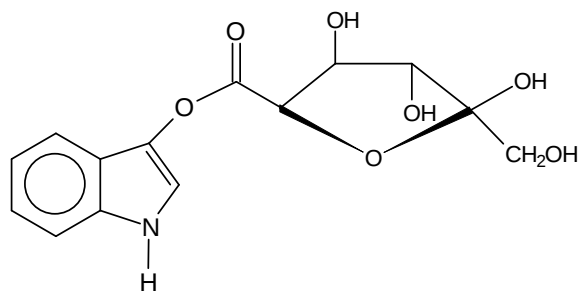


Figure 5. Indoxyle-5-cetogluconate ou Isatan B

Par la suite, des études ont révélé que différentes espèces d'*Isatis* contiennent à la fois, indicin et isatan B, ce dernier étant en plus grande quantité que le premier (Strobel & Groger, 1989). Zhia-Qiang et Meinhart (1992) ont isolé l'indicin dans *Isatis tinctoria*, *Polygonum tinctorium*, *Baphicacanthus cusia* et *Calanthe veratrifolia*. Grâce à ces études il est désormais admis que les espèces d'*Isatis* contiennent les deux précurseurs, l'isatan B étant majoritaire dans les feuilles, alors que les espèces du genre *Indigofera*, *Polygonum tinctorium* et d'autres plantes à indigo ne contiennent que de l'indicin.

Maugard et col.,(2001) découvrirent ensuite un nouveau précurseur de l'indigo dans les feuilles d'*Isatis tinctoria*, qu'ils appelèrent **isatan C**. Ce précurseur a fut provisoirement identifié comme dioxindole ester avec un poids moléculaire de 395,0 et une possible formule moléculaire $C_{20}H_{13}O_8N$ (Figure 6).

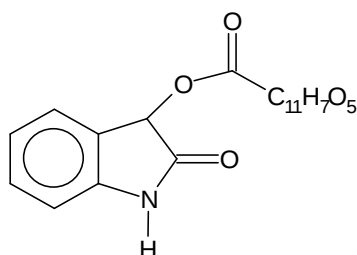


Figure 6. Dioxindole ester ou Isatan C

Plus récemment, à l'Université de Jena en Allemagne, Oberthür et col.(2004) ont extrait des feuilles d'*Isatis tinctoria* des précurseurs ayant une plus grande polarité que ceux de l'isatan B et de l'indican. Parmi ces substances, ils ont identifié un nouveau précurseur qu'ils ont nommé **Isatan A** (1*H*-indole-3-6'-*O*-(carboxyacetyl)- β -D-ribohex-3'-ulopiranoside). En outre, ils ont rectifié la structure de l'isatan B ; au lieu de l'indoxyle-5-cetogluconate, il s'agit du 1*H*-indole-3-il β -D-ribohex-3-ulopiranoside (Figure 7).

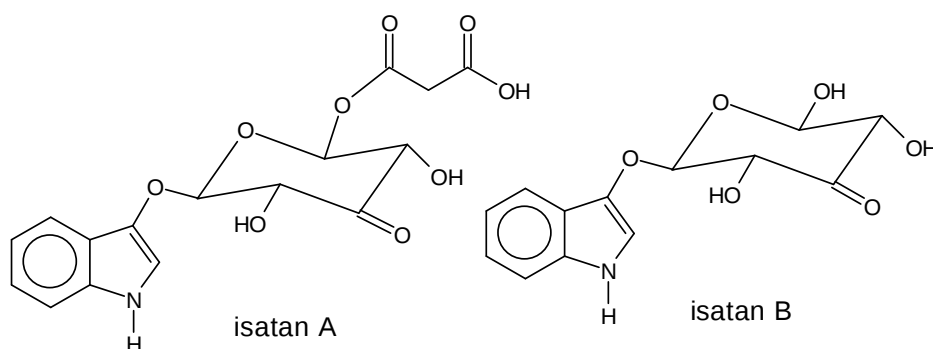


Figure 7. L'Isatan A et la nouvelle structure de l'Isatan B d'Oberthür

D'après ces études, l'isatan A s'est avéré le précurseur majoritaire et ce précurseur, ainsi que l'isatan B, ont produit de l'indigo sous traitement avec des bases ou des acides. De plus, ils ont émis l'hypothèse que l'indican pourrait être transformé en isatan A par l'action d'une enzyme oxyreductase.

Modèle chimique de la biosynthèse de l'indigo dans les plantes

Un modèle chimique a été établi dans le but d'essayer de comprendre l'évolution menant des précurseurs aux molécules colorées dérivées de l'indigo. On part des connaissances acquises sur la formation des précurseurs à partir de l'indole. Pendant l'extraction, ces précurseurs subissent une hydrolyse et libèrent de

l'indoxyle et du glucose. Cette hydrolyse est chimique - ou alcaline - pour les précurseurs du type ester (isatan A, isatan B et isatan C) qui se trouvent dans les feuilles d'*Isatis*, tandis que l'hydrolyse de l'indican (dans *Indigofera sp.*, *Polygonum tinctorium* et d'autres plantes à indigo) est réalisée par voie enzymatique.

Minami et col.,(1996) ont extrait de feuilles de *Polygonum tinctorium* une enzyme β -glucosidase qui hydrolyse l'indican, de même d'ailleurs que d'autres β -glycosides. Cette enzyme présente une activité élevée aux valeurs de pH comprises entre 5,5 et 7,5, et faible à pH 5,0. Ceci indique que ce catalyseur a des propriétés très particulières, car la plupart des glucosidases ont un intervalle de pH optimal compris entre 4,0 et 5,5. La stabilité thermique de cette enzyme a également été déterminée et on a trouvé qu'à une température de 37°C pendant un temps de 25 minutes ou à 0°C pendant une heure, son activité est réduite de 50%. À température de 60°C pendant 5 minutes l'activité enzymatique disparaît complètement. En outre, elle est inhibée par certains cations bivalents, tels que Cu^{2+} , Ag^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} et Cd^{2+} .

Il est donc établi que les méthodes d'extraction doivent être déterminées par le type de l'hydrolyse du précurseur majoritaire dans chacune des espèces végétales. De fait, la méthode d'extraction pour le pastel est faite par la voie alcaline et pour d'autres plantes indigofères on utilise la voie enzymatique. Cette différenciation est basée sur les propriétés chimiques des précurseurs.

L'hydrolyse des précurseurs libère l'indoxyle. Deux molécules d'indoxyle réagissent pour former de l'**indigo** ou de l'**indigotine**. L'indoxyle peut aussi s'oxyder pour donner de l'**isatine** qui à son tour réagit avec l'indoxyle pour former de l'**indirubine**. D'autre part, l'hydrolyse de l'isatan C donne du dioxindole et ensuite de l'isatine pour produire finalement de l'indirubine. L'indigotine et l'indirubine sont des isomères structuraux et ont des propriétés physiques et chimiques différentes (Figure 8).

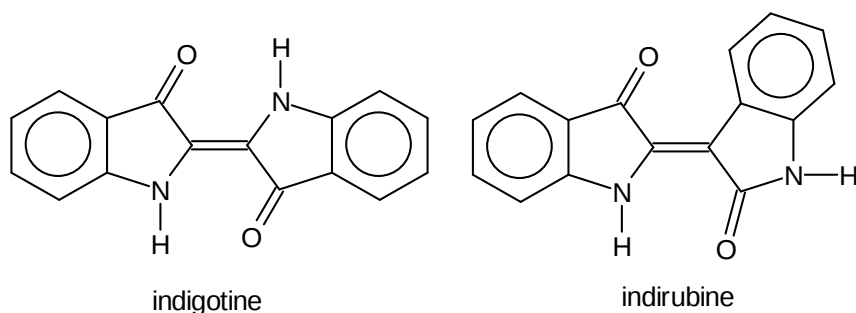


Figure 8. Les molécules dérivées de l'indigo

La Figure 9 montre le modèle chimique de l'évolution de l'indigo extrait de plantes.

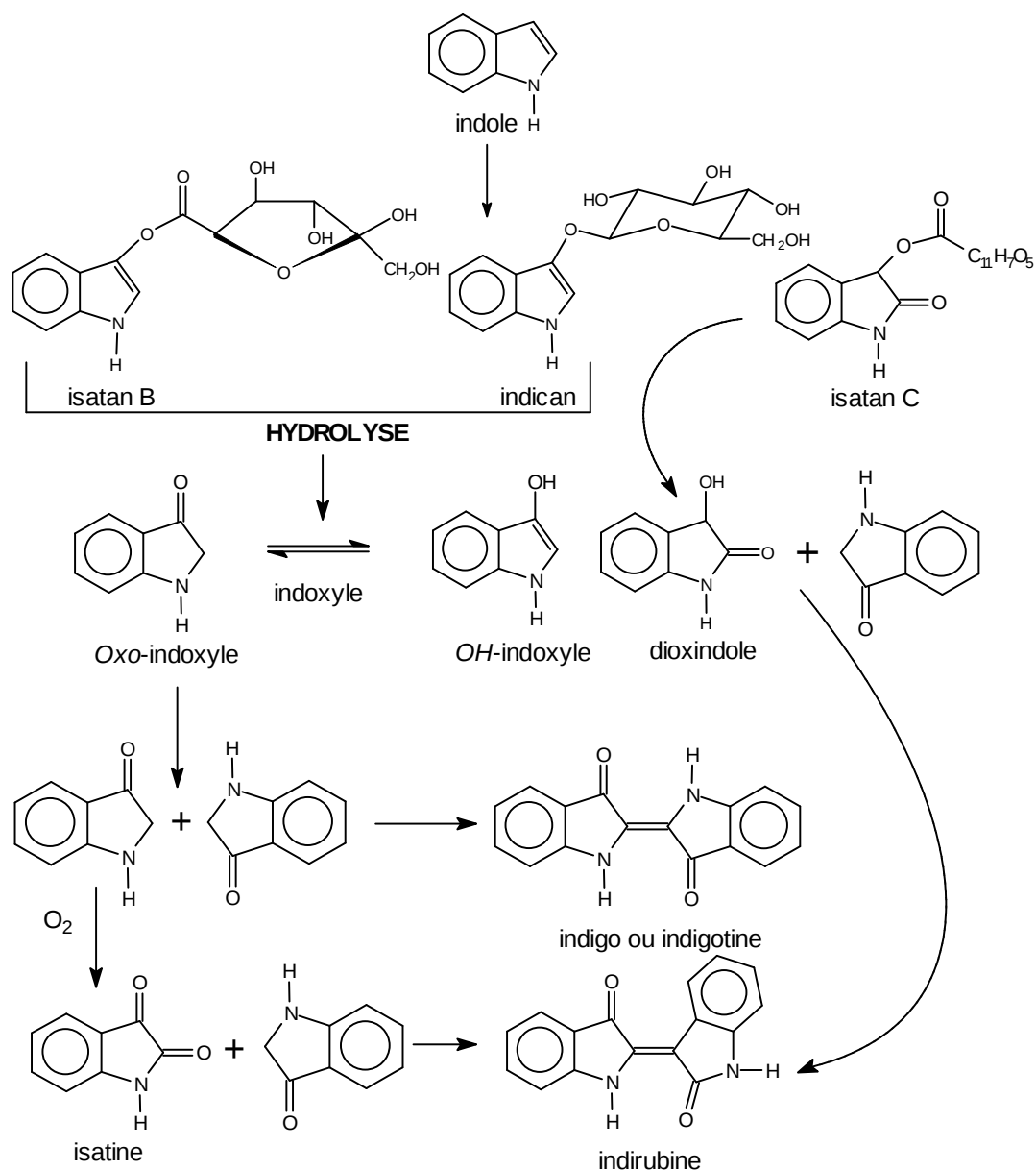


Figure 9. Modèle chimique de la formation des molécules colorantes de l'indigo (Kokubun et col., 1998 ; Stoker et col., 1998a ; Stoker et col., 1998b ; Maugard et col., 2001).

Méthode d'extraction de l'indigo à partir de feuilles de pastel

Stoker et col., (1998) ont proposé une méthode d'extraction commerciale d'indigo à partir des feuilles de pastel. Elle consiste à récolter les feuilles et les transférer dans un bassin dans lequel on ajoute de l'eau à température d'environ 38°C et à une valeur de pH de 3,5. On laisse macérer pendant 24 heures, ensuite on récupère le liquide dont on ajuste le pH à 9,0-10,0. L'indigo se forme par le changement du pH vers l'alcalinité et la présence de l'oxygène de l'air. Les bases théoriques de cette méthode reposent sur les propriétés de l'isatan B, le précurseur majoritaire dans le pastel. Ce précurseur a un lien du type ester et un sucre du type furanose qui permettent l'hydrolyse alcaline. Au cours de la macération, l'isatan B sort des cellules et des tissus des feuilles et se diffuse dans l'eau, ce qui donne un extrait assez concentré en précurseurs qui est hydrolysé par l'action des bases en libérant de l'indoxyle, lequel, à son tour, va former les colorants.

Méthode traditionnelle de l'extraction de l'indigo à partir des feuilles de l'añil

La méthode traditionnelle d'extraction de l'indigo à partir des feuilles d'añil en Oaxaca et au Michoacan (Mexique) consiste à disposer les tiges et feuilles d'añil dans une cuve que l'on remplit avec de l'eau à température ambiante et à les laisser macérer pendant 15 à 18 heures. Puis on transvase l'extrait dans une autre cuve et on agite le liquide pendant 6 à 8 heures. A ce point, le liquide prend une nuance vert foncé et en observant de près un échantillon de ce liquide on peut y voir de petits granules d'indigo bleu en suspension (Binniza, 1999). Dans le cas de l'añil, le seul précurseur dans les feuilles est, selon la littérature, l'indican, glucoside ayant une liaison du type éther et un glucose du type pyranose. L'indican étant très résistant à l'hydrolyse alcaline, l'action d'une enzyme glucosidase est nécessaire pour aboutir à la production d'indigo et d'indirubine. En ce cas, on peut établir l'existence de deux étapes dans l'extraction, la première consistant dans la diffusion de l'indican dans le milieu réactionnel, et la deuxième dans son hydrolyse par agitation et oxygénation de l'indoxyle.

Nouvelle approche sur la nature de l'indican dans l'extraction des feuilles de l'añil

Nos essais d'extraction d'indigo à partir des feuilles d'añil ont fourni des données intéressantes sur le comportement du précurseur présent dans cette espèce. Nous avons trouvé qu'il est possible faire une sorte d'extraction alcaline, ce qui en principe nous permet d'établir l'hypothèse que l'añil pourrait avoir un glycoside du type ester comme l'isatan B. En ce moment, il n'y a aucun rapport dans la

littérature concernant l'existence d'un précurseur de ce type dans les espèces d'*Indigofera*.

Or, le processus d'extraction employé au Mexique par les producteurs n'utilise aucune substance alcaline et tout indique au contraire que l'extraction se fait par la voie enzymatique.

L'explication à cette apparente contradiction est basée sur un modèle théorique qui impliquerait la transformation de l'indican en indican B sous l'effet d'une élévation de la température. Or, l'indican B est un précurseur facilement hydrolysable par une base. Dans la pratique, une température d'environ 70°C favorise cette conversion (Figure 10).

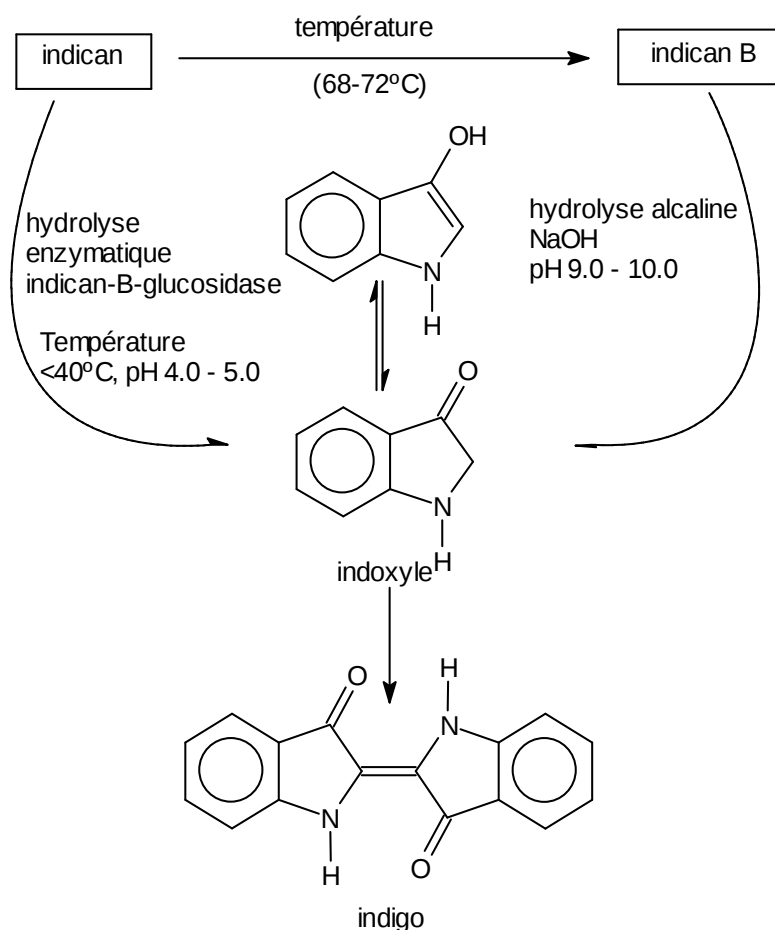


Figure 10. Modèle théorique de la transformation de l'indican en indican B

Si, pendant l'extraction, les feuilles d'añil sont exposées à une température inférieure à 40°C, l'hydrolyse de l'indican est possible par l'action d'une glucosidase, mais si les feuilles subissent des températures d'environ 70°C, du fait de la destruction des enzymes, l'extraction se ferait par la voie alcaline. Cependant, à une température d'environ 70°C, l'indican subit une transformation et devient susceptible d'être hydrolysé dans un milieu alcalin et donc de libérer de l'indoxyle.

Nous avons essayé de faire les deux types d'extractions, à savoir, l'extraction enzymatique et l'extraction alcaline et d'en déterminer les rendements respectifs.

Expérimentation

Matière végétale

Les feuilles d'añil appartiennent à la collection de l'état de Guerrero cultivée à Chapingo au Mexique. Les plantes sont élaguées au mois de février et on a utilisé des feuilles fraîches âgées de 3 mois et demi.

Extraction enzymatique

Des feuilles d'añil ont été récoltées et lavées à l'eau courante et elles ont été mises dans une fiole avec de l'eau distillée qui a été recouverte avec du papier aluminium et placée dans un espace ouvert qui a été exposé au soleil. Les feuilles sont restées en macération pendant 24 heures jusqu'à ce que l'extrait devienne vert foncé avec une nuance violacée sur la surface. Les feuilles ont alors été séparées de l'extrait par filtration et ce dernier a été agité à 50 rpm pendant 6 heures à l'aide d'un agitateur Mod Talboys 102 (N.J., États Unis). Au cours de l'agitation, l'extrait a pris une coloration bleue et les particules d'indigo ont commencé à être visibles. L'extrait aqueux d'indigo a été analysé au spectrophotomètre.

Extraction alcaline

Des feuilles fraîches d'añil ont été récoltées et lavées à l'eau courante puis ont été mises dans une fiole avec de l'eau distillée. Le récipient a été chauffé à 70°C puis on a laissé refroidir le liquide à environ 40°C. Les feuilles ont été séparées de l'extrait par filtration sur papier et l'extrait liquide a été ajusté à l'aide de NaOH pour lui donner un pH d'environ 10,5. L'extrait a pris une couleur bleu foncé après 10 minutes d'agitation et on l'a analysé au spectrophotomètre.

Analyse spectrophotométrique de l'indigo

On a pris une quantité de 2,0 ml d'extrait et on l'a dissous dans 40 ml de *N*-métilpirrolidinone (NMP) et 0,5% de 2,6-di-tert-butyle-4-méthylphénol (BHT)(García-Macias et Jhon, 2004). Les échantillons ont été passés au sonicateur pendant 2 minutes et on a pris 10 ml qui ont été mis dans la cellule du spectrophotomètre.

On a lu les échantillons dans un spectrophotomètre Milton Roy au Laboratoire d'Agronomie et Agroressources de l'Université de Chapingo à une longueur analytique de $\lambda = 610 \text{ nm}$. Chaque type d'extraction a été répété trois fois. À partir des valeurs d'absorbance on a pu calculer la concentration d'indigo des échantillons, à l'aide de la courbe d'étalonnage qui a résulté de l'analyse du standard d'indigo synthétique Sigma-Aldrich (Mexique) : $y = 0,0136 x - 0,0002$, où x représente la valeur d'absorbance de l'analyse.

Résultats

Les rendements sont exprimés en milligrammes d'indigo par gramme de poids sec de feuilles d'añil ($\text{mg indigo.g p.s.}^{-1}$) et les moyennes des extractions sont indiquées dans la Figure 11.

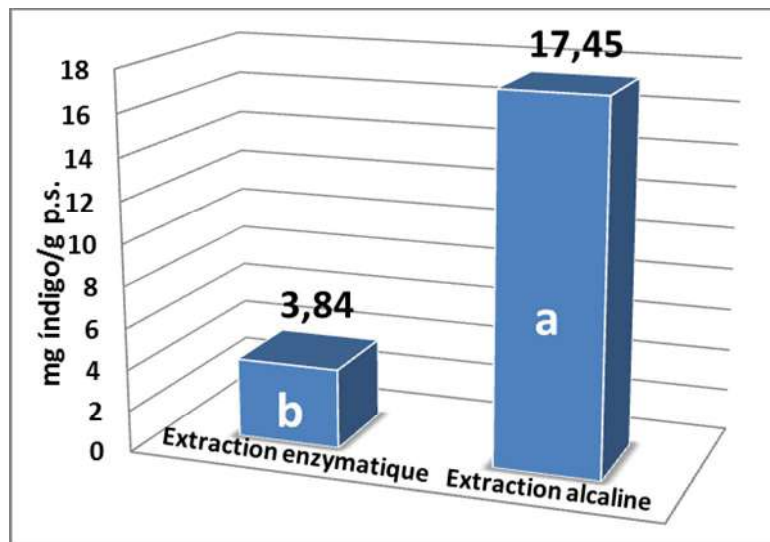


Figure 11. Rendements des deux procédés d'extraction

Le rendement en indigo obtenu par l'extraction alcaline a atteint des valeurs en moyenne de 17,45 mg par gramme de poids sec de feuilles, et 3,84 mg dans l'extraction enzymatique. Les données ont été examinées par l'analyse de variance et on a constaté des différences très significatives entre les deux traitements dans un niveau $\alpha = 0.01$. (Tableau 1).

Sources de Variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés des écarts	Carrés moyens	F ₀	F _{14, 0,01}
Traitements	1	277,84	277,84	87,01	21,198
Erreur	4	12,77	3,19		
Totale	5	290,62			

Tableau 1. Analyse de la variance des données des extractions d'indigo alcaline et enzymatique.

L'hypothèse nulle testée est la suivante : $H_0 = \mu_1 = \mu_2$ en contre de $H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$. Cette hypothèse nulle a été testée conformément à la règle de décision suivante ; On rejette H_0 si :

$$F_0 > F^1_{4, \alpha=0.01}$$

Selon des essais préliminaires, on a trouvé qu'il y a un poids à sec de 14%. Autrement dit, il y a 14 grammes de poids sec dans 100 grammes de matière fraîche. Cela signifie qu'au niveau expérimental, on obtient 2,44 et 0,5 grammes d'indigotine par kilogramme de feuilles fraîches dans des extractions alcaline et enzymatique, respectivement. Ce qui précède indique que l'extraction alcaline a des rendements plus élevés que l'extraction traditionnelle ou enzymatique.

Conclusion

Selon les résultats de nos essais il est possible de conclure qu'on peut améliorer la production d'indigo de l'añil en utilisant la méthode d'extraction alcaline. Dans notre stratégie de recherche est envisagé le passage au niveau pilote 1 avec une plus grande quantité de feuilles, et, de plus, de quantifier la pureté des extraits solides blues obtenus et leurs concentrations en indigotine et indirubine. Au Mexique, des producteurs d'indigo sont intéressés par ces recherches, en vue d'améliorer leurs rendements et la qualité du pigment produit.

Il est en outre possible d'adapter cette nouvelle méthode à d'autres régions productrices d'Amérique central et de faire des essais d'application avec d'autres espèces d'*Indigofera*.

Du point de vue de la recherche fondamentale, il faut encore étudier plus en détail le comportement des précurseurs de l'indigo. L'avenir peut réserver de grandes surprises quant à l'identification de la nature de ces molécules et leur évolution pendant l'extraction. La présence éventuelle de l'isatan B dans les feuilles des *indigotiers* est une hypothèse à envisager, ainsi que la possibilité d'une hydrolyse oxydative ayant pour effet de libérer des dérivés d'indoxyle. Ce sont là deux pistes pour les recherches futures.

Références Bibliographiques

- Beijerinck, M. K. 1899. The production of indigo from woad (*Isatis tinctoria*). *Nature* 61(1568):71.
- Binniza, A.C. Centro de Investigaciones y Desarrollo. 1999. El Añil en Oaxaca. En: *El Tecolote*. Boletín de la Comisión de Defensa Ecológica. Año VI. 3^a. Época. No. 1 pp-2-7. Oaxaca, Mexique.
- Cardon, D. 2007. *Natural Dyes – Sources, Tradition, Technology and Science*. London : Archetype Publications.
- Epstein, E., Nabors, M.W. and Stowe, B.B. 1967. Origin of indigo of woad. *Nature* 216(11):547-549.
- García-Macías, P. et John, P. 2004. Formation of Natural Indigo Derived from Woad (*Isatis tinctoria* L.) in Relation to Product Purity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:7891-7896.
- Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J., Noble, M., Lawrie, A., Tunnah, P., Leost, M., Damiens, E., Marie, D., Marko, D., Niederberger, E., Tang, W., Eisenbrand, G. and Meijer, L. 1999. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nature Cell Biology* 1:60-67.
- Hoogewerff, S. and Meulen, H. 1900. Contribution to the knowledge of indican. *Proc. Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences* 2, 1899-1900:520-525.
- Kokubun, T., Edmonds, J. and Jhon, P. 1998. Indoxyl derivatives in Woad in relation to medieval indigo production. *Phytochemistry* 49(1):79-87.
- Ku, Q. V. 1997. El añil en el sur del Istmo oaxaqueño. Perspectivas de sustentabilidad de los sistemas agrícolas actuales. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 87 p.
- Lambert, H. 2005. Résumé de l'intervention au Congrès International Indigo et colorants naturels. En: *Les Travaux de L'Académie des Arts & des Sciences du Pastel* No. 01-Juin 2005, Toulouse, France, pp-4-5.
- Leclerc, S., Garnier, M., Hoessel, R., Marko, D., Bibb, J.A., Snyder, L.G., Greengard, P., Biernat, J., Wu, Y.Z., Mandelkow, E.M., Eisenbrand, G. and Meijer, L. 2001. Indirubins Inhibit Glycogen Synthase Kinase-3 β and CDK5/P25, Two Protein Kinases Involved in Abnormal Tau Phosphorylation in Alzheimer's Disease. *J. Biol. Chem.* 276(5):251-260.
- Maugard, T., Enaud, E., Choisy, P. and Legoy, D. 2001. Identification of an indigo precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (Woad). *Phytochemistry* 58:897-904.
- Minami, Y., Kanafuji, T. and Miura, K. 1996. Purification and characterization of a β -Glucosidase from *Polygonum tinctorium*, Which catalyses preferentially the hydrolysis of indican. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(1):147-149.
- Oberthur, C., Schneider, B., Graf, H., and Hamburger, M. 2004. The Elusive Indigo Precursors in Woad (*Isatis tinctoria* L.)- Identification of the Major Indigo Precursor, Isatan A, and a Structure Revision of Isatan B. *Chemistry & Biodiversity* 1:174-182.

- Strobel, J. und Groger, D. 1989. Über das Vorkommen von Indigovorstufen in *Isatis*-Species. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 184:321-327.
- Stoker, K.G., D.T. Cooke and D. J. Hill. 1998a. Influence of light on natural indigo production from woad (*Isatis tinctoria*). *Plant Growth Regulation* 25:181-185.
- Stoker, K.G., D.T. Cooke and D. J. Hill. 1998b. An Improved Method for the Large-Scale Processing of Woad (*Isatis tinctoria*) for Possible Commercial Production of Woad Indigo. *J. Agric. Engng. Res* 71:315-320.
- Shunck, E. 1855. X. On the formation of indigo-blue. Part I. *Philosophical Magazine Serie 4* 15(97):73-95.
- Vilarem, G. 1999. La chimie du Pastel. *Espaces pour Demain* 61:16-17.
- Zhia-Quiang, X. and Meinhart, H.Z. 1992. Biosynthesis of indigo precursors in higher plants. *Phytochemistry* 31(8):2695-2697.