

TP 3 — Organisation d'un laboratoire type de Biochimie Végétale et Appliquée.

I. Objectifs pédagogiques

1. Identifier et décrire les équipements spécifiques d'un laboratoire de biochimie végétale appliquée ;
2. Comprendre les principes de la distillation, de l'extraction Soxhlet et de l'évaporation rotative ;
3. Maîtriser les règles de sécurité liées à l'utilisation des solvants organiques ;
4. Appliquer les procédures d'utilisation du four à moufle et du dessiccateur.

II. Introduction

Le laboratoire de biochimie végétale et appliquée est spécialisé dans l'extraction, la séparation et la purification de molécules d'origine végétale (polyphénols, huiles essentielles, pigments, alcaloïdes, composés bioactifs) ainsi que dans la détermination de la composition chimique des aliments et des végétaux. Ce laboratoire fait un usage intensif de solvants organiques et de techniques thermiques. La maîtrise des règles de sécurité (ventilation, hottes chimiques, EPI adaptés aux solvants) est donc particulièrement critique.

III. Équipements du laboratoire de Biochimie Végétale

1. Appareil de distillation

Rappel — Types de distillation

La distillation est une technique de séparation basée sur les différences de points d'ébullition entre composés. On distingue :

- Simple : séparation d'un solvant d'un mélange (3 fractions : tête, cœur, queue) ;
- Avec rectification : séparation de 2 solvants à points d'ébullition bien différents ;
- Fractionnée : séparation de plusieurs solvants à T° d'ébullition proches (colonne de Vigreux) ;
- Sous pression réduite : pour solvants à haute T° d'ébullition (> 160°C) — évite la dégradation thermique.

Composantes du montage de distillation simple

1. Ballon en verre borosilicaté (fond rond) sur chauffe-ballon ou bain-marie ;
2. Colonne de distillation avec thermomètre positionné au niveau du col de distillation ;
3. Réfrigérant à eau (réfrigérant de Liebig) : condensation de la vapeur ;
4. Adaptateur et flacon récepteur avec barboteur de garde ;
5. Pierre ponce ou barreau magnétique (évite les projections par ébullition irrégulière).

⚠ En présence de solvants inflammables (éthanol, éther, hexane, acétone) : interdiction de flamme nue. Utiliser exclusivement un bain-marie ou chauffe-ballon électrique. Travailler impérativement sous hotte chimique.

2. Appareil d'extraction Soxhlet

L'extracteur Soxhlet (*Friedrich Franz von Soxhlet, 1879*) réalise une extraction solide-liquide en continu par reflux du solvant. Il permet l'épuisement complet d'une matrice solide par un solvant de faible polarité (hexane, éther de pétrole) pour extraire les corps gras, les cires, les huiles essentielles.

Principe de fonctionnement

1. Le solvant dans le ballon est chauffé → vaporisation ;
2. La vapeur monte et se condense dans le réfrigérant → retombe sur la cartouche d'extraction (contenant l'échantillon dans un dé en cellulose) ;
3. Le solvant imprégné l'échantillon, solubilise les composés cibles, puis se déverse par siphon dans le ballon quand le niveau atteint le bras de siphon ;
4. Le cycle se répète automatiquement (20–50 cycles en 6–8 heures).

Applications

- Détermination de la teneur en matières grasses ;
- Extraction des huiles essentielles et des antioxydants végétaux ;
- Extraction des résidus de pesticides pour analyse GC/MS.

3. Évaporateur rotatif (Rotavapeur)

L'évaporateur rotatif (*Rotavapeur ou Rotovap*) permet d'évaporer rapidement un solvant à basse température et sous pression réduite, sans dégrader les composés thermosensibles extraits. Il est utilisé pour concentrer et purifier les extraits végétaux après extraction.

Composantes

- Ballon d'évaporation rotatif (200 mL à 5 L) — en rotation constante pour augmenter la surface d'évaporation ;
- Bain-marie chauffant (25–60°C selon le solvant) ;
- Système d'étanchéité (joint tournant) et bras d'immersion en verre ;
- Réfrigérant en verre (serpentin refroidi à -10°C à +20°C) ;
- Piège à solvant (ballon collecteur) ;
- Pompe à vide (vide réglable 10–900 mbar) avec vanne de régulation ;
- Afficheur numérique : température du bain, pression, vitesse de rotation.

Précautions d'utilisation

- Récupérer et traiter les solvants selon les règles d'élimination des déchets chimiques ;
- Ne jamais dépasser la température d'ébullition du solvant sous la pression utilisée ;
- Travailler sous hotte chimique lors des manipulations de solvants.

4. Four à moufle

Le four à moufle (température : 50°C à 1200°C) est utilisé pour les opérations nécessitant des températures très élevées sans contact direct de la flamme avec l'échantillon (la moufle isole thermiquement l'enceinte).

Applications en biochimie végétale et alimentaire

- Minéralisation (incinération) des échantillons — détermination des cendres totales selon les normes ISO ;
- Analyse élémentaire des minéraux (après minéralisation, dissolution et dosage ou absorption atomique) ;
- Préparation des creusets en platine ou céramique (résistants aux chocs thermiques).

Composantes

- Corps de chauffe intégré dans la sole (non apparent) avec moufle sur toute la surface ;
- Isolation double paroi (céramique réfractaire) — température extérieure basse ;
- Cheminée d'extraction des vapeurs (évacuation vers l'arrière ou l'extérieur) ;
- Porte en céramique et acier avec joint réfractaire ;
- Régulateur de T° programmable (rampe de chauffage contrôlée).

⚠ Utiliser obligatoirement des pinces à creuset en acier inoxydable. Ne jamais introduire de matières organiques humides (explosion de vapeur). Laisser refroidir à l'air ambiant avant de déplacer les creusets.

5. Hotte chimique (Hotte cabine)

La hotte chimique est l'équipement de protection individuelle et collective indispensable lors de la manipulation de solvants volatils, d'acides concentrés et de tout produit dégageant des vapeurs toxiques ou inflammables.

Types de hottes

- Hotte à visière : protection du visage lors de manipulations à risque d'éclaboussures ;
- Hotte cabine : couvre complètement le poste de travail — aspiration réglable de 50 à 450 m³/h — filtre HEPA ou charbon actif ;
- Hotte à flux laminaire (PSM) : spécifique à la microbiologie — protection du produit, environnement et du manipulateur.

Règles d'utilisation

- Maintenir la façade frontale à la hauteur d'utilisation préconisée (≤ 45 cm) ;
- *Ne jamais travailler avec la façade frontale entièrement ouvert ;*
- *Ne pas stocker de produits ou matériels dans la hotte.*

6. Dessiccateur

Le dessiccateur est un récipient hermétique contenant un agent desséchant (*silicagel*) utilisé pour maintenir des échantillons ou appareils en atmosphère sèche (humidité $\approx 0\%$), évitant ainsi toute réabsorption d'humidité atmosphérique.

Utilisations

- Conservation des creusets après minéralisation jusqu'à peser (évite l'absorption d'humidité et les erreurs de pesée) ;
- Conservation des produits hygroscopiques (*silicagel régénéré*) ;
- Refroidissement des creusets chauds provenant du four à moufle.

7. Réfrigérateur et Congélateur

Type	Température	Application principale
Réfrigérateur conservateur	2 à 8°C	Réactifs, solutions tampons, échantillons biologiques, milieux de culture
Congélateur basse T°	-15 à -35°C	Conservation longue durée des enzymes, des extraits végétaux
Congélateur ultra-basse T°	-60 à -86°C	Conservation des souches microbiennes, des acides nucléiques, des biomolécules fragiles