

# L'esperimento di MAX von LAUE



I Dipartimenti di Chimica, Fisica e Scienze della Terra dell'Ateneo di Parma, in occasione delle celebrazioni mondiali per il centenario dell'esperimento di Max von Laue sulla diffrazione dei raggi X, hanno presentato agli studenti delle scuole superiori del nord Italia le ultime e più innovative applicazioni della diffrattometria dei raggi X.



Hanno partecipato all'evento le classi 2<sup>A</sup>B e 2<sup>A</sup>C della sezione classica del nostro Liceo, accompagnate dai Docenti S. Manghi, M. Zurli e G. Baricca.

*Parma, 12 dicembre 2012 - Auditorium del Campus*

# 100 anni di diffrazione: il mondo dei cristalli dal granato al ribosoma

9.30 – 10.00 Inaugurazione, Saluto del Magnifico Rettore

10.00 – 10.30 Un secolo di onde e cristalli e le applicazioni nel mondo dei minerali - *Prof. Mario Tribaudino*

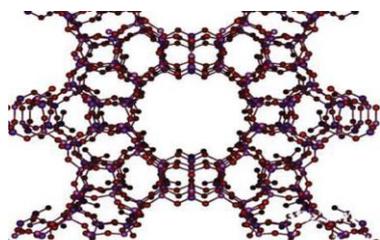
(*Dipartimento di Fisica e Scienze della Terra*)

10.30 – 11.00 I cristalli, la chimica e le scienze della vita - *Prof. Alessia Bacchi* (*Dipartimento di Chimica*)

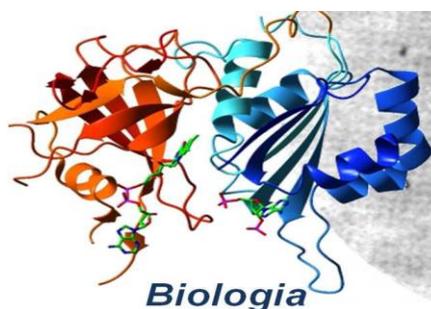
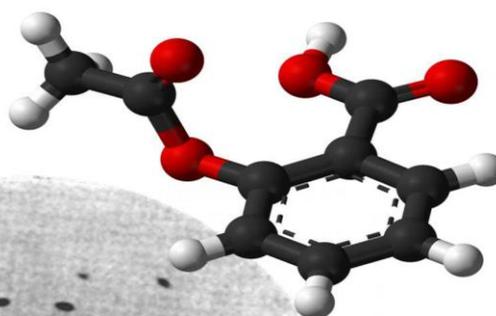
11.00 – 11.30 *Coffee break*

11.30 – 12.00 La crescita dei cristalli - *Prof. Andrea Zappettini* (*IMEM-CNR*)

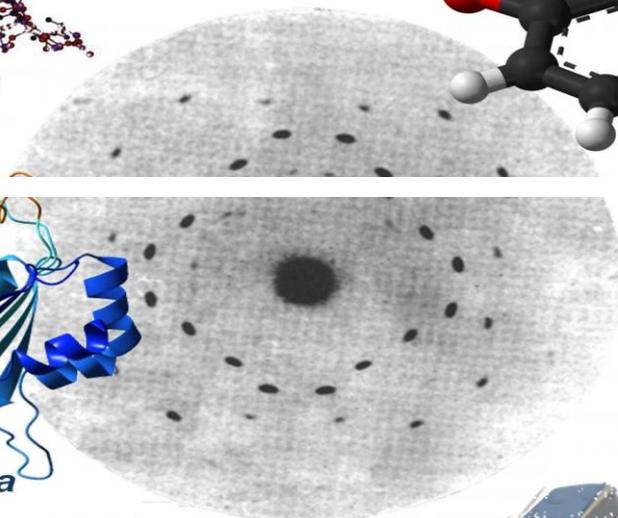
12.00 – 12.30 I cristalli e la scienza dei materiali - *Prof. Gianluca Calestani* (*Dipartimento di Chimica*)



**Scienza dei Materiali**



**Biologia**



**MINERALOGIA**



**FISICA DELLO STATO SOLIDO**

## Cenni storici

1864 Viene cristallizzata l'emoglobina.

1912 Facendo attraversare dai raggi X un cristallo di solfuro di zinco Von Laue ottiene i primi diffrattogrammi. W.L. Bragg e W.H. Bragg propongono una correlazione semplice tra la figura di diffrazione ottenuta con i raggi X e la disposizione degli atomi nel cristallo che ha generato la figura (legge di Bragg).

Anni '30 Bernal, Crowfoot, Bragg, ottengono i primi diffrattogrammi da cristalli di proteine (insulina, emoglobina, mioglobina).

1941 Atsbury ottiene il primo diffrattogramma ai raggi X del DNA.

1951 Pauling e Corey propongono la struttura di  $\alpha$ -elica e foglietto  $\beta$  in base a considerazioni teoriche.

1953 Watson e Crick propongono la struttura a doppia elica del DNA sulla base delle analisi diffrattometriche ai raggi X di Franklin e Wilkins.

1954 Perutz e coll. elaborano i metodi basati sull'impiego dei metalli pesanti per risolvere il problema delle fasi nella cristallografia ai raggi X.

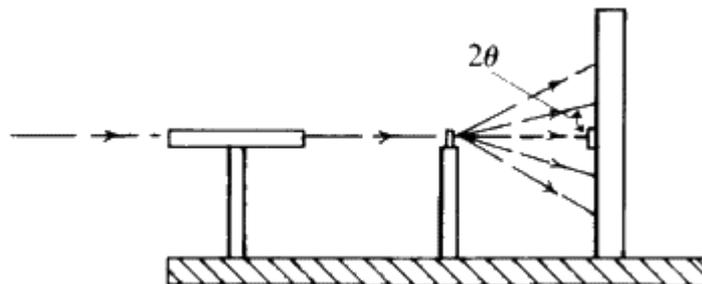
1960 Kendrew descrive la struttura della mioglobina a una risoluzione di 2 Å. Perutz propone la struttura della emoglobina, più grande, ad una risoluzione inferiore.

Anni '80 Hartmut Michel risolve la struttura (3 Å) della prima proteina di membrana (centro di reazione fotosintetico).

2000 Vengono risolte le strutture (3 Å) delle subunità L e S del ribosoma (circa 1.5 e 1 MDa rispettivamente).

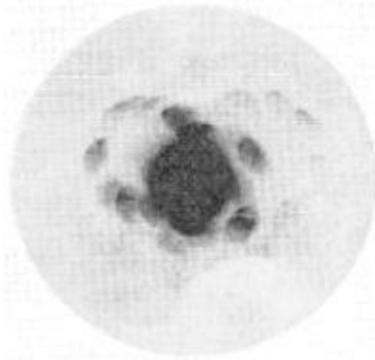
### L'esperimento di Laue 100 anni dopo

Il 2012 è il centenario della cristallografia a raggi X: è stato nel 1912, infatti, che Max von Laue, con Paul Knipping e Walter Friedrich, pubblicò i risultati del primo esperimento di diffrazione di raggi X da parte di un cristallo. Laue era un fisico teorico tedesco (Pfaffendorf, 9 ottobre 1879 – Berlino, 24 aprile 1960 – Premio Nobel per la fisica nel 1914), che ebbe il merito di pensare ad un esperimento completamente nuovo mettendo insieme informazioni e dati che, allora, erano assai poco sicuri, e di interpretare elegantemente, anche se solo parzialmente, i risultati ottenuti. La riuscita pratica dell'esperimento si deve invece all'abilità di Knipping e Friedrich, il primo appena laureato con Röntgen, ed il secondo assistente di Sommerfeld.

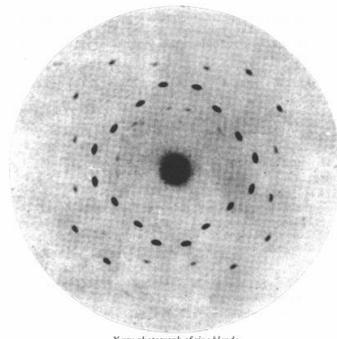


**La tecnica Laue consiste nell'inviare su un cristallo immobile un fascio di raggi X policromatico, e nel registrare (in condizioni di trasmissione oppure in backscattering o radiazione di ritorno) i fasci diffratti.**

Nel 1912 furono così dimostrate contemporaneamente la natura ondulatoria dei raggi X e la natura reticolare dei cristalli. Immediatamente dopo, l'interpretazione di Paul Ewald, il lavoro di Bragg padre e Bragg figlio, le applicazioni della tecnica a strutture sempre più complesse, incluse le macromolecole, la soluzione di problemi teorici notevoli segnano la storia di questi 100 anni, costellati da un gran numero di premi Nobel. Il primo esperimento fu fatto con un cristallo di solfato di rame, triclino, in una orientazione casuale.

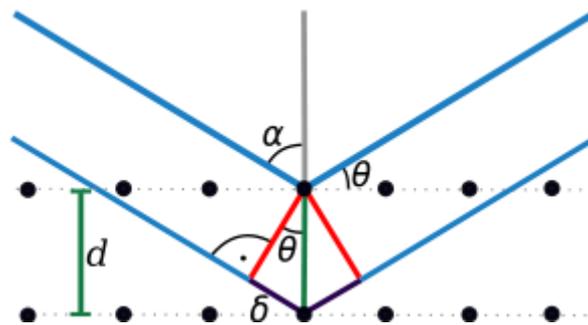


Per gli esperimenti successivi fu utilizzato un cristallo di blenda, cubico, orientato lungo gli assi di simmetria.



*X-ray photograph of zinc blende*

### Legge di Bragg



Facendo incidere un'opportuna onda elettromagnetica su di un cristallo si osservano fenomeni di interferenza, causati dalla riflessione di onde da parte di piani cristallini diversi ma paralleli. Questo fenomeno fu interpretato per la prima volta da William Henry Bragg e suo figlio William Lawrence nel 1913, riassunto nella cosiddetta legge di Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin(\theta) \quad \text{dove:}$$

- $\theta$ (theta) è l'angolo che il fascio incidente forma col piano cristallino,
- $\lambda$ (lambda) è la lunghezza d'onda della radiazione
- $d$  è la distanza tra due piani adiacenti
- $n$  indica l'ordine della diffrazione (tipicamente solo quello per  $n=1$  è apprezzabile).

La formula si spiega in maniera analitica considerando una differenza di cammino ottico pari a  $2d \sin(\theta)$ . La legge di Bragg può essere interpretata geometricamente nello spazio reciproco come sfera di Ewald.

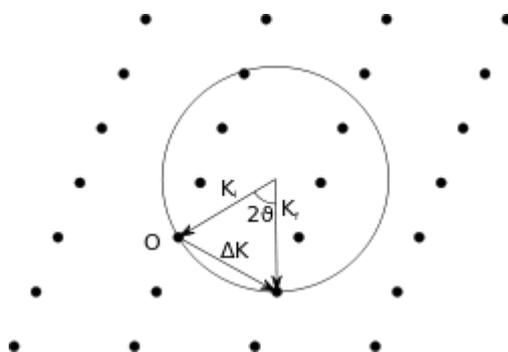
## Sfera di Ewald

La sfera di Ewald è una costruzione geometrica usata nella cristallografia con elettroni, neutroni e raggi X che evidenzia il legame tra:

- la lunghezza d'onda dell'onda incidente e dell'onda diffratta;
- l'angolo di Bragg per una data riflessione;
- il reticolo reciproco di un cristallo

La costruzione fu concepita dal fisico tedesco e cristallografo Paul Peter Ewald chiamandola sfera delle riflessioni.

La sfera di Ewald può essere usata per trovare la massima risoluzione possibile per una data lunghezza d'onda e la dimensione della cella unitaria. Spesso è mostrato nella versione bidimensionale chiamata cerchio di Ewald.



Costruzione della sfera di Ewald

Un cristallo può essere descritto da un reticolo di punti. La condizione per avere una interferenza costruttiva è che le possibili variazioni del vettore d'onda formino un reticolo nello spazio dei momenti (il reticolo reciproco). Per esempio, il reticolo reciproco di una struttura cubica semplice è ancora un cubo semplice. Lo scopo della sfera di Ewald è di determinare quale piano del reticolo cristallino (a cui corrisponde un punto nel reticolo reciproco) è associato ad una diffrazione osservata per una certa lunghezza d'onda incidente.

L'onda piana incidente sul cristallo ha come vettore d'onda  $K_i$  il cui modulo è  $2\pi/\lambda$ . L'onda piana riflessa ha vettore d'onda  $K_f$ . Se non varia l'energia nel processo di diffrazione (cioè è elastico) allora  $K_f$  ha lo stesso modulo di  $K_i$ . Il vettore di scattering è definito dalla variazione del vettore d'onda  $\Delta K = K_f - K_i$ . Poiché i due vettori d'onda hanno lo stesso modulo allora il vettore di scattering disegnato a partire da  $K_i$  deve stare su una sfera di raggio  $2\pi/\lambda$ . Questa sfera è la sfera di Ewald.

I punti del reticolo reciproco sono i valori del momento trasferito quando la legge di Bragg è soddisfatta. Vale anche che per avvenire una diffrazione deve essere tale che il vettore di scattering sia un vettore del reticolo reciproco. Geometricamente questo vuol dire che se l'origine dello spazio reciproco è posta sulla punta del vettore  $K_i$  allora la diffrazione avviene solo per quei punti del reticolo reciproco che appartengono alla superficie della sfera di Ewald.

## Microscopia ottica e cristallografia a raggi X

Il microscopio ottico consente di studiare molto dettagliatamente oggetti di piccole dimensioni, come insetti o preparati cellulari, ma non riesce a risolvere dettagli più piccoli della metà della lunghezza d'onda utilizzata. (es. luce blu  $\approx$  200 nm).

Per risolvere dettagli atomici, che sono dell'ordine di 1-5 Å (0.1-0.5 nm), è necessaria una radiazione elettromagnetica con una lunghezza d'onda molto più bassa delle radiazioni visibili: i **raggi X**.

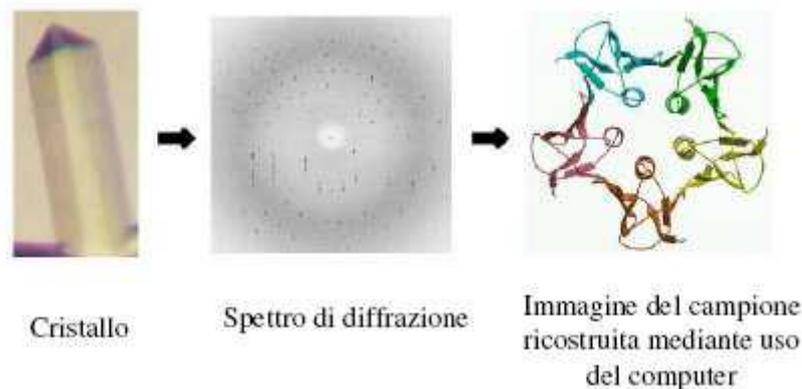
Un microscopio ottico ed un dispositivo a raggi X si fondano sugli stessi principi di base, sebbene le applicazioni pratiche siano del tutto differenti, date le differenti proprietà dei raggi X e della luce visibile.

In un microscopio, la luce proveniente da una sorgente luminosa irradia l'oggetto e viene diffusa in tutte le direzioni. Per generare dalla luce diffusa (cioè dalle onde della luce riflesse dall'oggetto) un'immagine allargata dell'oggetto originale, viene impiegata una serie di lenti.

In un esperimento coi raggi X, un fascio di raggi X proveniente da una sorgente colpisce il cristallo e i raggi vengono diffusi in tutte le direzioni, proprio come succede con la luce di un microscopio ottico.

Tuttavia, fino ad oggi non vi sono lenti in grado di focalizzare i raggi X diffusi per ricostruire un'immagine allargata del campione.

Ciò che il cristallografo può fare è registrare direttamente i raggi X diffusi (lo spettro di diffrazione del cristallo) e ricostruire un'immagine allargata del campione mediante uso del computer.



- Dallo spettro di diffrazione dei raggi X dei cristalli, i cristallografi sono in grado di calcolare mappe di densità elettronica le quali, in pratica, sono immagini delle molecole che formano il cristallo ingrandite circa cento milioni di volte.
- Si esaminano le mappe di densità elettronica con la grafica computerizzata e se ne verifica l'accordo (fitting) con un modello molecolare.
- Dopo le fasi di affinamento si riesce ad ottenere un modello molecolare che ha un errore medio sulle coordinate di 0.3-0.5 Å che permette al ricercatore di esaminare molto dettagliatamente la struttura tridimensionale delle proteine.

### I raggi X sono diffusi dagli elettroni

Sebbene i raggi X interagiscano solo debolmente con la materia, essi sono occasionalmente assorbiti dagli elettroni, che cominciano ad oscillare.

Questi elettroni oscillanti funzionano a loro volta come sorgenti di raggi X che possono inviare fotoni di raggi X in ogni direzione. I fotoni di radiazioni X, diffusi da differenti parti del cristallo devono sommarsi costruttivamente per produrre un'intensità misurabile.

La condizione sotto cui i raggi diffusi si sommano costruttivamente è dettata dalla legge di Bragg, che tratta i cristalli come famiglie di piani paralleli (piani reticolari).

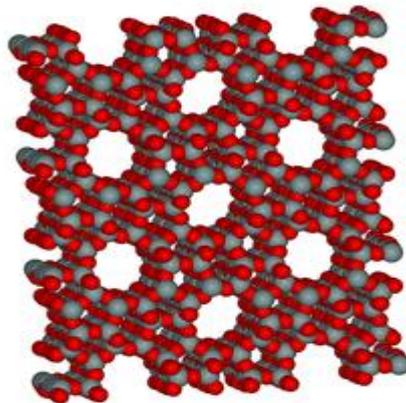
Dato che numerose molecole organiche, inorganiche e biologiche formano cristalli (tra questi, ad esempio, i sali, i metalli ed i semiconduttori) la cristallografia è utilizzata in numerose applicazioni scientifiche in campi differenti. Nel primo decennio di utilizzo questo metodo ha permesso di determinare la grandezza degli atomi, la lunghezza ed il tipo dei legami chimici e lo studio su scala atomica delle differenze tra i vari materiali in particolare metalli e leghe. Questa tecnica ha anche permesso di studiare la struttura ed il funzionamento di molte molecole biologiche, incluse le vitamine, proteine e acidi nucleici come quelli presenti nel DNA. La cristallografia a raggi X è ancora il metodo principalmente utilizzato per la caratterizzazione atomica dei nuovi materiali e per differenziare materiali che appaiono simili ad altre tecniche di indagine. La struttura cristallina ottenuta dai raggi X può spiegare la presenza di inusuali proprietà elastiche e elettroniche in un materiale.

In una misura di diffrazione a raggi X un cristallo è montato su un goniometro e gradualmente ruotato mentre viene bombardato con raggi X che producono una figura di diffrazione di punti regolarmente spaziatati. Se il cristallo è troppo piccolo o non omogeneo questo risulta in una bassa risoluzione dell'immagine.

La cristallografia a raggi X è uno dei metodi per determinare le strutture atomiche insieme allo scattering di elettroni o neutroni. Tale processo può essere descritto come lo scambio di energia tra due particelle che non modifica la natura delle particelle stesse.

Se non si possono ottenere cristalli di grandezza sufficiente è possibile applicare altre tecniche a raggi X per ottenere informazioni meno dettagliate sul cristallo come la diffrazione di raggi X su fibra, la diffrazione da polveri e la tecnica SAXS (small-angle X-ray scattering). Se il materiale da esaminare è disponibile solo in forma di polveri nanocristalline o soffre di bassa cristallinità possono essere applicati i metodi della cristallografia elettronica per la determinazione della struttura atomica.

Per tutti i metodi menzionati qui sopra lo scattering è elastico; i raggi X diffratti hanno la stessa lunghezza d'onda di quelli incidenti. Per contro metodi di scattering inelastico di raggi X sono utilizzati per studiare gli stati eccitati di un campione.



**La cristallografia a raggi X può localizzare ogni atomo nella zeolite un alluminosilicato utilizzato in applicazioni come la purificazione dell'acqua.**

## Diffrazione ai raggi X nei ribosomi

I ribosomi sono una delle meraviglie del mondo cellulare che si possono esplorare visitando gli archivi PDB (Protein Data Bank - archivio per dati di struttura in 3-D di proteine e acidi nucleici). Nell'anno 2000, i biologi strutturali V. Ramakrishnan, T. Steitz e A. Yonath hanno reso disponibili nel PDB le prime strutture di subunità ribosomiali. Nel 2009 hanno vinto il premio Nobel per questo lavoro. Oggi sono disponibili le strutture di molte altre molecole coinvolte nella sintesi proteica, compresi gli RNA-transfer e i fattori di allungamento. A partire da queste strutture sono state ricostruite centinaia di strutture di ribosomi interi che rivelano i dettagli atomici di molti dei passaggi della sintesi proteica.

### Ribosomi in azione

Dopo avere risolto le strutture delle due subunità, piccola e grande, dei ribosomi, il passo successivo nella ricerca è stato quello di determinare la struttura del ribosoma intero. Questo ha rappresentato il completamento di una ricerca durata decine di anni e cominciata con le prime immagini sfocate di ribosoma ottenute al microscopio elettronico, continuata con ricostruzioni più dettagliate di micrografia crioelettronica, e ora arrivata con la diffrazione ai raggi x a strutture che mostrano la posizione dei singoli atomi. Utilizzando piccoli frammenti di mRNA, varie forme di tRNA accorciato o chimicamente modificato, fattori proteici purificati e ribosomi modificati, i ricercatori hanno determinato la struttura dei ribosomi nell'atto di sintetizzare le proteine.

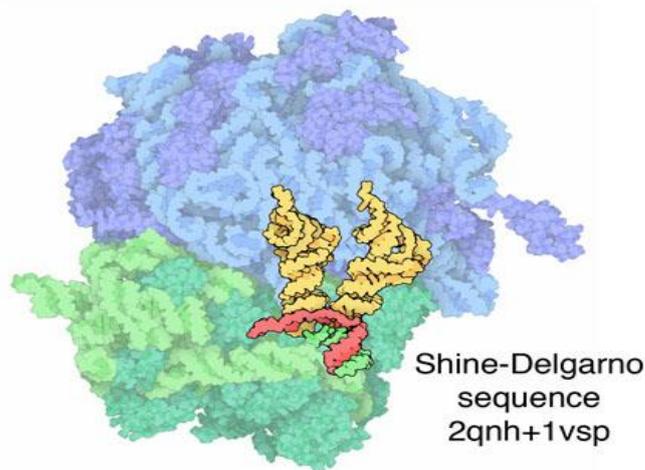
### Ribosomi 70S

Osservando le forme di vita sulla Terra, troviamo che tutti gli organismi viventi hanno ribosomi e che questi sono sostanzialmente di due misure. I batteri e gli archeobatteri hanno ribosomi più piccoli chiamati ribosomi 70S, che sono composti di una subunità minore 30S e di una maggiore 50S. La S sta per Svedbergs o fattore di Sedimentazione che misura quanto velocemente la molecola si muove in una centrifuga. Da notare che questi valori non sono additivi, cioè 30 più 50 non fa 70, infatti la velocità di sedimentazione è proporzionale alla massa e alla forma della molecola, ma non in modo lineare. I ribosomi delle nostre cellule, come quelli degli altri animali, delle piante e dei funghi, sono più grandi e vengono detti ribosomi 80S, sono composti di una subunità minore 40S e di una subunità maggiore 60S. Stranamente i nostri mitocondri hanno ribosomi piccoli 70S che vengono sintetizzati in loco e sono diversi da quelli più grandi presenti nel citoplasma. Questa osservazione ha suggerito l'ipotesi che i mitocondri (e così pure i cloroplasti nelle cellule vegetali) siano in realtà dei batteri che sono stati catturati all'interno di cellule più evolute all'inizio dell'evoluzione delle cellule eucariote (teoria endosimbiontica di Lynn Margulis). Oggi vivono e si riproducono all'interno delle nostre cellule dove si occupano della produzione di energia e si affidano alla cellula ospite per la maggior parte delle loro necessità.

Le prime strutture di ribosoma ottenute molti anni addietro, anche se poco dettagliate, hanno rivelato le caratteristiche di base dei ribosomi. Hanno dimostrato che sono **ribozimi**, cioè enzimi fatti di RNA, infatti usano RNA e non proteine per catalizzare la loro reazione. Questo ha avvalorato l'idea che l'RNA è stato fondamentale nella prima parte dell'evoluzione della vita perchè può svolgere contemporaneamente sia il ruolo di enzima (oggi svolto dalle proteine) sia quello di trasmettere il patrimonio genetico (oggi svolto dal DNA). Le prime strutture hanno anche mostrato l'importanza delle proteine ribosomiali per stabilizzare e tenere in forma la struttura dell'RNA nel ribosoma. Le strutture ottenute recentemente, però, sono molto più dettagliate e permettono di investigare a livello atomico il meccanismo della lettura dell'informazione genetica e della sintesi

delle proteine. La biosintesi delle proteine si svolge in tre tappe fondamentali: **inizio**, **allungamento**, **terminazione**. Negli archivi PDB sono disponibili strutture che illustrano ognuna di queste tre fasi.

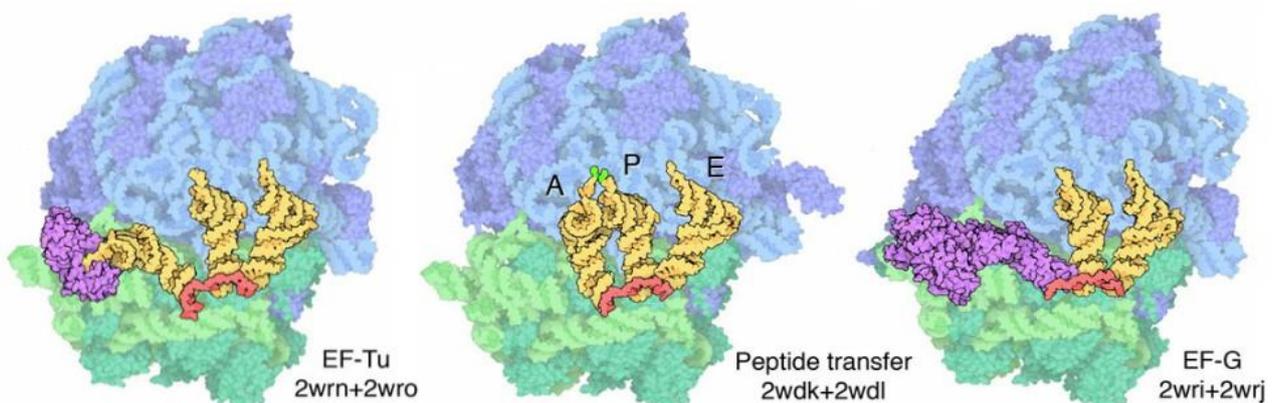
## Inizio



Il ribosoma comincia ad agire in un processo chiamato inizio. Alcune proteine, chiamate fattori di inizio, trasportano l'mRNA alla subunità minore, allineano la prima parte dell'mRNA e promuovono l'associazione con la subunità maggiore. La struttura illustrata qui sopra, (PDB **2qnh** e **1vsp**), mostra una particolare sequenza nell'mRNA, chiamata sequenza Shine-Delgarno dai suoi scopritori, che è associata con l'ultima parte della catena di RNA della subunità minore. Questo fa allineare l'mRNA nel punto giusto e lo predispone a legarsi con uno speciale tRNA iniziatore. In questa figura, un piccolo tratto di mRNA è mostrato in rosso, mentre il tRNA è illustrato in giallo.

## Allungamento

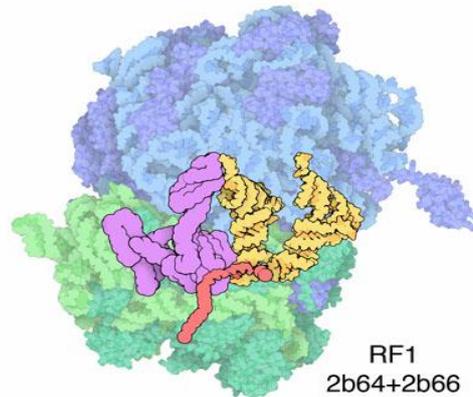
Dopo che il ribosoma è stato assemblato, comincia a scorrere lungo la catena di mRNA e a costruire la proteina, un amminoacido alla volta. Nella struttura mostrata qui sulla sinistra (PDB **2wrn** e **2wro**), un nuovo tRNA viene trasportato da un fattore di allungamento, la proteina **EF-Tu** (magenta).



Nella struttura di centro (PDB **2wdk** e **2wdl**), tre molecole di tRNA sono legate all'interno del ribosoma. Il tRNA di sinistra (nel sito A, amminoacido) trasporta l'amminoacido che deve essere aggiunto, il tRNA centrale (nel sito P, proteina) lega la catena proteica in crescita, mentre il tRNA

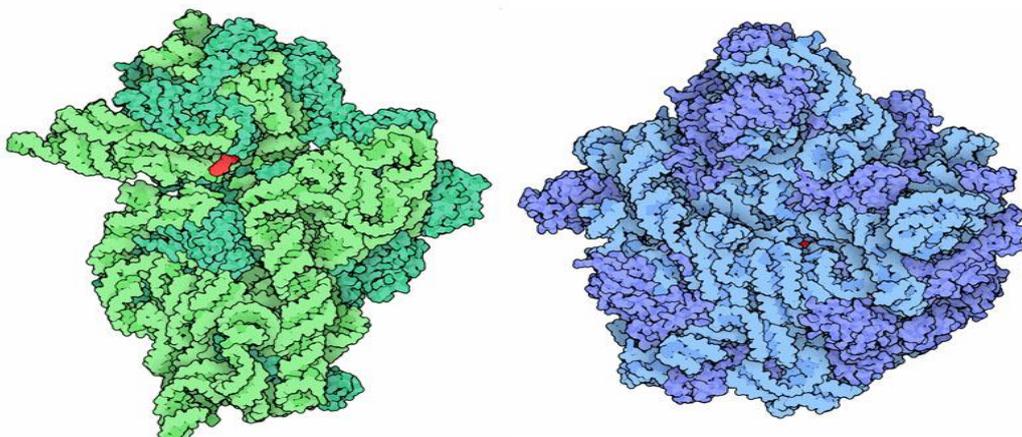
di destra (nel sito E, exit) ha finito il suo compito ed è pronto per essere espulso. La catena proteica viene trasferita dal tRNA centrale al tRNA del sito A (piccola molecola verde). Nella struttura sulla destra, la proteina **EF-G** ha aiutato a spingere verso sinistra il ribosoma rispetto all'mRNA liberando così il sito A (PDB **2wri** e **2wrj**), in questo modo il processo può ricominciare come nella prima figura di sinistra con l'arrivo nel sito A di un nuovo tRNA trasportato dal fattore di allungamento EF-Tu.

### Terminazione



Alla fine del gene, cioè alla fine del tratto di mRNA che codifica per la proteina, il ribosoma incontra un codone di stop (per es la tripletta di basi UGA) che gli dice di smettere di costruire la proteina. Speciali proteine chiamate fattori di rilascio riconoscono il codone di stop e costringono il ribosoma a rilasciare la proteina finita. Questa struttura (PDB **2b64** e **2b66**) mostra uno dei fattori di rilascio (magenta) legato al codone stop dell'mRNA nel sito A del ribosoma. Questa struttura è stata ottenuta a bassa risoluzione, quindi mostra in modo un po' approssimato il legame con la proteina fattore di rilascio e così pure non contiene le parti terminali dell'mRNA che sono state aggiunte con un programma di modellistica molecolare.

### Ribosomi e antibiotici

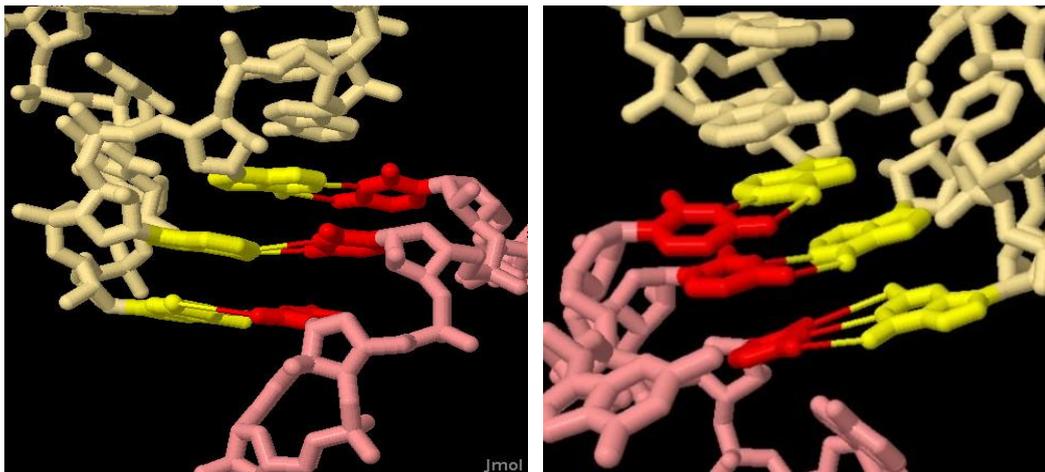


Dato che i ribosomi sono essenziali per la vita, sono un bersaglio ideale per i farmaci antibiotici. Naturalmente è indispensabile che l'antibiotico attacchi solo i ribosomi dei batteri senza colpire i

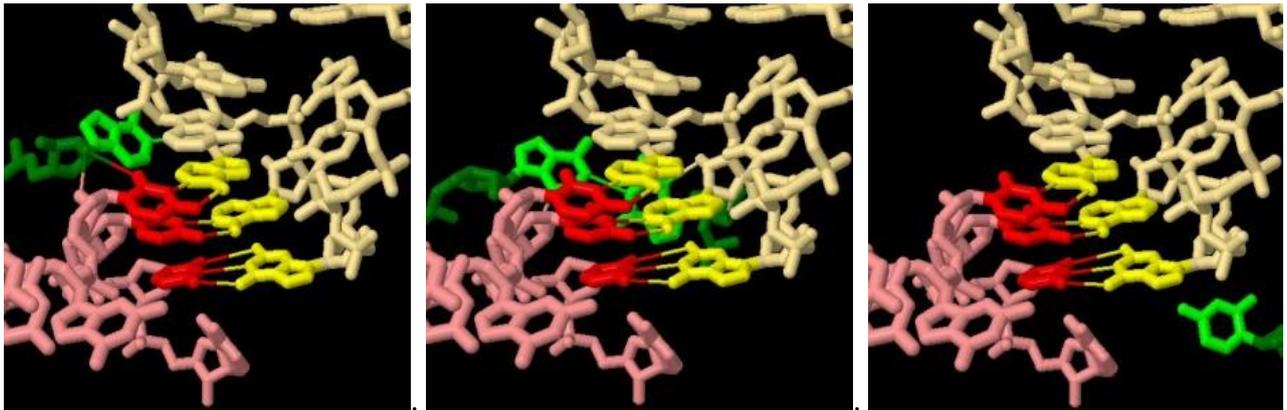
nostri altrimenti uccideremmo anche noi stessi insieme con l'infezione. Per fortuna, i ribosomi dei batteri hanno molte piccole differenze rispetto ai nostri e quindi ci sono molti antibiotici che attaccano in modo specifico i ribosomi 70S. Qui sopra ne sono mostrati due esempi, ma ce ne sono molti altri negli archivi PDB. Sulla sinistra è illustrata una **tetraciclina** (rossa) legata alla subunità minore del ribosoma (PDB **1hnw**), dove impedisce il legame con l'mRNA. Sulla destra è mostrato il **cloramfenicolo** (rosso) legato in un punto del ribosoma (PDB **1nji**) che impedisce la reazione che aggiunge nuovi amminoacidi alla catena proteica in crescita.

## Esplorare la Struttura

Le nuove strutture di ribosomi interi 70S rivelano il segreto della vita. Le figure qui sotto mostrano un primo piano del centro di decodifica del ribosoma (PDB **2wdg**). Questo è il luogo dove l'**anticodone del tRNA** in arrivo (giallo) si accoppia con il **codone dell'mRNA** (rosso). Come si può immaginare, è essenziale che questo accoppiamento sia perfetto per cui solo il giusto tRNA si può legare al suo codone e così solo il corretto amminoacido può essere aggiunto alla catena della proteina in crescita. Il ribosoma utilizza molte interazioni per controllare l'accoppiamento, assicurando così che le basi azotate di codone e anticodone siano accoppiate in modo corretto.



Nelle tre immagini qui sotto, si può vedere in dettaglio l'accoppiamento codone-anticodone rispetto alle tre paia di basi coinvolte. Alcune porzioni del ribosoma (verde) interagiscono col tRNA (giallo) e con l'mRNA (rosso) in corrispondenza delle tre paia di basi di codone e anticodone. Nelle tre immagini sono mostrate solo le parti del ribosoma che interagiscono rispettivamente con la prima, la seconda e la terza coppia di basi. Nelle prime due immagini si vede che le interazioni che controllano l'accoppiamento delle prime due paia di basi sono numerose e assicurano così che solo le basi che si accoppiano alla perfezione possano legarsi. Nell'ultima immagine, invece, si vede che la terza coppia di basi è controllata solo da una debole interazione che consente molta libertà, infatti spesso in questa terza posizione si possono trovare basi diverse non perfettamente accoppiate. E' per questo che talvolta uno stesso amminoacido può essere codificato da più triplette che sono uguali nelle prime due posizioni, ma che possono differire nella terza. Per esempio la serina viene codificata da quattro diversi codoni: **UCU, UCC, UCA, UCG**.



## Cioccolato, quando la struttura molecolare influisce sul gusto

Il cielo visto attraverso la chioma di una grande quercia. Così il chimico Peter Fryer descrive la struttura del cioccolato. Se potessimo sbirciare l'anima di una tavoletta, vedremmo piccoli cristalli di burro di cacao e di zucchero organizzati in fitte reti intricate, proprio come i rami e le foglie compongono l'intreccio naturale delle fronde di un albero. La disposizione fisica delle singole molecole attribuisce al cioccolato le caratteristiche organolettiche che lo rendono apprezzabile da tutti i palati. E non è solo una questione di tipologia: al latte, fondente, con le nocciole e così via. Andiamo dritti alla sostanza! A seconda di come le molecole si posizionano nello spazio, si hanno consistenze e *texture* differenti e, di conseguenza, anche gusti distinti. Due cioccolatini preparati a partire dalla fusione dello stesso cioccolato possiedono una struttura differente a seconda di come il burro di cacao e lo zucchero si dispongono, ma anche a seconda della geometria microscopica del burro di cacao.



E' da pochi anni che conosciamo a fondo la struttura, o meglio le sei strutture, del cioccolato. Nel 2000 un'equipe di chimici britannici, grazie all'applicazione della diffrazione di raggi X e alle strumentazioni che analizzano le proprietà termiche dei materiali sottoposti a raffreddamento, sono riusciti a individuare le sei strutture che può assumere microscopicamente il burro di cacao (ved. tabella). Quest'ultimo è costituito da una miscela di trigliceridi, composti a loro volta da tre molecole di acidi grassi e da una di glicerina. Il trigliceride prende un nome differente a seconda dell'acido che lo costituisce: si chiama POP il trigliceride formato da due molecole di acido palmitico agli estremi ed una di acido oleico al centro; POS è quello composto dall'acido palmitico, oleico (al centro) e stearico; prende il nome di SOS il trigliceride costituito dall'acido oleico al centro e da due molecole di stearico agli estremi. I pasticceri prediligono la struttura che più delle altre favorisce il rapido scioglimento quando il pezzetto di cioccolato arriva in bocca, attorno ai 32°C. La struttura, chiamata 'Forma V' è quella che più si avvicina a questa caratteristica. Ha una temperatura di fusione di circa 33,8°C (il valore esatto cambia a seconda della composizione esatta

del burro di cacao, che varia al variare dell'origine e del tipo di cacao utilizzato) e si manifesta con quel bel aspetto lucido, estremamente piacevole alla vista e soprattutto al gusto. Col tempo però questa struttura instabile tende a trasformarsi nella 'Forma VI', molto meno piacevole ma più stabile. Il cioccolato che rimane in dispensa per lungo tempo e diventa biancastro e poco gustoso rientra in questa categoria. Ci sono accorgimenti e 'trucchi' per rendere il cioccolato lucido, la tecnica precisa prende il nome di **temperaggio** (ved. ricetta) e consiste nel portare il cioccolato a tre diversi livelli di temperatura così da raggiungere la stabilità della 'Forma V' e migliorarne la brillantezza e la consistenza.

### **Tabella: Polimorfismo del burro di cacao**

Polimorfismo	Punto di fusione (°C)	Condizioni
Forma I	17,3	Raffreddamento rapido
Forma II	23,3	Raffreddamento rapido a 2°C, poi 1 ora a 0°C
Forma III	25,5	Solidificazione a 5-10°C
Forma IV	27,3	Solidificazione a 16-21°C
Forma V	33,8	Dopo il temperaggio. Lucida e compatta
Forma VI	36,3	Dalla Forma V (4 mesi a temp. ambiente)

### **RICETTA: Sacher sfavillante grazie al temperaggio**



- Fondere il cioccolato ad una temperatura massima di 40°
- Farlo raffreddare, abbassando la temperatura a 26-27°
- Metterlo nuovamente sul fuoco a bagnomaria per riportare la temperatura a 31°

Utilizzate ora il cioccolato ottenuto come più vi piace, o mettendolo nelle formelle per i cioccolatini, oppure, molto più scenografico, utilizzandolo per ricoprire la Sacher Torte.