

## A concentration matrix procedure for determining optimal combinations of concentrations in biocrystallization

*Jens-Otto Andersen, Machteld Huber, Johannes Kabl,  
Nicolaas Busscher and Angelika Meier-Ploeger*

### *Summary*

An integral part of the biocrystallization method is the determination of suitable concentrations of the sample in question and the reagent copper chloride. Traditionally concentrations series are applied whereby an increasing amount of sample (juice/extract) is added to a fixed amount of reagent (200 mg per solution per plate). At a so-called optimal concentration the resulting pictures show an optimum of desired morphological features which enable differentiation of various samples. These series represent a one-dimensional procedure for determining an optimal sample concentration. The article presents the concept of concentration matrix as a two-dimensional procedure for determining an optimal combination of concentrations of the sample and the reagent. Graphically the concentrations of the sample and the reagent are arranged on the horizontal and vertical axes respectively. The optimal combination may generally be determined on the basis of two consecutive matrices. The initial broad matrix is arranged with a broad concentration range of both the sample and the reagent while the subsequent narrow matrix is arranged with a narrower range of concentrations around the expected optimal combination, as expressed in a near-equilibrium of features characterizing the sample and the reagent. Two broad matrices from wheat and carrot are presented. The procedure is expected to be applicable to a broad variety of samples and investigations, and to allow efficient differentiation of various samples.

### *Zusammenfassung*

Ein integraler Bestandteil der Biokristallisationsmethode ist die Bestimmung des Konzentrationsbereiches der zu untersuchenden Probe und des Reagenz Kupferchlorid. Üblicherweise werden Konzentrationsreihen erstellt, wobei mit ansteigender Probenmenge (Saft/Extrakt) bei gleicher Kupferchloridmenge (200 mg pro Lösung pro Platte) gearbeitet wird. Die so genannte optimale Konzentration zeigt ein Optimum ausgewählter morphologischer Kriterien, wo sich ein Gleichgewicht des Einflusses von Probe und Reagenz auf die morphologischen Kriterien ergibt, und mit dem verschiedene Proben getrennt werden können. Diese Serien repräsentieren eine ein-dimensionale Matrix für die Bestimmung der optimalen Probenkonzentration. In der hier vorgelegten Arbeit wird das Konzept einer zwei-dimensionalen Matrix zur Ermittlung der optimalen Kombination von Probe und Reagenz vorgestellt. Dabei wird die Konzentration der Probe auf der x-Achse und die des Reagenz auf der y-Achse aufgetragen. Die optimale Konzentration wird dann durch zwei aufeinanderfolgende Matrices ermittelt: Die erste Matrix deckt einen großen Konzentrationsbereich ab, während die zweite Matrix

den Bereich direkt um das Optimum repräsentiert, wo die optimale Kombination gefunden wird. In der vorliegenden Arbeit werden entsprechende Matrices von Möhren und Weizenproben vorgestellt und diskutiert. Das Prinzip der Konzentrationsmatrix zur Bestimmung der optimalen Kombination von Proben und Reagenzkonzentration lässt sich nach Meinung der Autoren auf eine Vielzahl von Proben und Fragestellungen übertragen.

## 1 Introduction

The copper chloride crystallization method, also termed the biocrystallization method, was originally introduced by *Pfeiffer* (1930). It is based on the crystallographic phenomenon that occurs after adding specific inorganic ionic substances and generally all organic substances to an aqueous solution of dihydrate copper chloride. Hereby crystallization pictures with reproducible dendritic textures are formed during crystallization (*Kleber/Steinike-Hartung* 1959). The method has been applied for examining the effects of different farming systems, fertilization practices and processing on the pictomorphological properties of agricultural and horticultural samples (*Engqvist* 1989; *Balzer-Graf* 1996; *Weibel et al.* 2000). The morphological features observed in the pictures are influenced by a complex set of factors including the procedures used for sample preparation, the applied concentrations of the sample (extract/juice) and the reagent copper chloride, the crystallization equipment and the physical conditions during evaporation and crystallization (*Ballivet et al.* 1999; *Busscher et al.* 2003). The pictures may be evaluated visually as well as by means of computerized image analysis (*Andersen et al.* 1999).

So-called concentration series are widely applied for determining an optimal concentration of the sample. In these an increasing amount of sample is added to a fixed amount of the reagent (200 mg per solution per plate; in the following referred to in short as mg per plate) (*Selawry/Selawry* 1957; *Selawry* 1961; *Engqvist* 1970). It is argued that the resulting pictures may be characterized in the following way: "Zusätze um 0.01-0.03 g Pflanzensaft (von Getreide-Körnern) zu 0.2 g Kupferchlorid pro Platte zeigen ein harmonisches, gleichmäßiges Kristallisationsbild, das als koordinierte Ganzheit imponiert. Die Nadelung ist gleichmäßig über das Gesamtbild ausgebreitet, die Nadelzüge sind zu gekrümmten, derben Ästen gefügt, die Seitenäste in einem bestimmten Aufzweigungswinkel bilden und sich zu Feinstrukturen aufgliedern. Das Bild ist nach Keimzone, Mittelzone und Randzone optimal ausgeprägt. Dabei entstehen sehr verschiedene, aber zusatzcharakteristische Bilder, die morphologischen Typen entsprechen. Die Eigengestaltung des Kupferchlorids und die Formkraft des Zusatzes stehen hier in harmonischem Gleichgewicht." (*Selawry* 1961)

It may be argued that all agricultural crops represent unique plants which may not be expected all to generate optimal pictures on the basis of a one-dimensional procedure involving only a single concentration of the reagent. Thus *Pettersson* (1966) argues, based on a comparison between two potato samples, that the pictures showing an equilibrium of the morphological features characterizing the sample and the reagent, as well as those discriminating most easily the two potato samples, are generated on the basis of a concentration of reagent rather different from 200 mg per plate. The author examines three one-dimensional concentration series (increasing the amount of sample with a fixed amount of reagent; increasing the amount of reagent