

STANDART TEST PROSEDÜRÜ :**A. NUMUNE ÇIKARMA:**

1. Yakl. 1 g numune malzemesini 75 mL'lik bir cam behere koyun. 20 mL hidroklorik asit (0,66 M) ekleyin, beheri folyo ile kapatın ve oda sıcaklığında en az 3 saat (tercihen kolaylık sağlamak için gece boyunca) kuvvetlice karıştırın.

2. 1 mL ekstraktı 1,5 mL'lik bir mikrofüj tüpüne aktarın ve 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjleyin. Elde edilen ekstrakt süpernatantının 0,5 mL'sini hemen yeni bir 1,5 mL'lik mikrofüj tüpüne aktarın ve 0,5 mL sodyum hidroksit çözeltisi (0,75 M) ekleyerek nötralize edin. Aşağıda açıklanan enzimatik fosforilasyon reaksiyonu prosedüründe nötralize numune ekstraktı kullanın.

B. ENZİMATİK DEFOSFORİLASYON REAKSİYONU:

- Reaksiyon tüpü : Mikrofüj tüpü (1,5 mL)
- Sıcaklık : ~ 40°C
- Nihai hacim : 1,39 mL

Pipette into 1.5 mL microfuge tubes	Free Phosphorus	Total Phosphorus
distilled water	0.62 mL	0.60 mL
solution 1 (buffer)	0.20 mL	0.20 mL
sample extract	0.05 mL	0.05 mL
suspension 2 (phytase)	-	0.02 mL
Mix by vortex and incubate in a water bath set at 40°C for 10 min. After 10 min, start the next reaction by addition of:		
distilled water	0.02 mL	-
solution 3 (buffer)	0.20 mL	0.20 mL
suspension 4 (ALP)	-	0.02 mL
Mix by vortex and incubate in a water bath set at 40°C for 15 min. After 15 min, stop the reaction by addition of:		
trichloroacetic acid (50% w/v)	0.30 mL	0.30 mL
Centrifuge the terminated reaction at 13,000 rpm for 10 min. Do not mix the tube after centrifugation. Carefully pipette the supernatant for colourimetric determination of phosphorus (see section C, page 8).		

C. FOSFORUN RENKLİMETRİK TAYİNİ: MANUEL FORMAT**NOTLAR:**

Fosforun kolorimetrik tayinine uygulanan her numune grubu için, aynı renk reaktifi grubu kullanılarak eş zamanlı olarak bir fosfor kalibrasyon eğrisi gerçekleştirilmelidir (bkz. aşağıdaki bölüm D).

- **Dalga boyu** : 655 nm
- **Küvet** : 1 cm ışık yolu (cam veya plastik; 1,5 mL yarı mikro)
- **Sıcaklık** : ~40°C
- **Nihai Hacim** : 1,5 mL
- **Basit Çözüm** : 0,5-7,5 µg fosfor (1,0 mL numune hacminde)
- **Havaya karşı okuma** : (ışık yolunda küvet olmadan) veya suya karşı okuyun

Pipette into a 1.5 mL microfuge tube	Sample
sample or phosphorus standard colour reagent	1.00 mL 0.50 mL
Mix by vortex and incubate in a water bath set at 40°C for 1 h. After 1 h, mix by vortex and then transfer 1 mL to a semi-micro cuvette and read the absorbance at 655 nm (A_{655}) within 3 h.	

D. FOSFOR KALİBRASYON EĞRİSİNİN HAZIRLANMASI:

Standart fosfor solüsyonlarını aşağıdaki tabloda açıklandığı gibi hazırlayın ve fosforun kolorimetrik tayini için numune olarak işleyin (yukarıdaki C bölümüne bakın). 4°C'de 1 hafta stabildir.

Pipette into 13 mL polypropylene tubes	STD 0 (0 µg)	STD 1 (0.5 µg)	STD 2 (2.5 µg)	STD 3 (5 µg)	STD 4 (7.5 µg)
distilled water	5.00 mL	4.95 mL	4.75 mL	4.50 mL	4.25 mL
phosphorus standard soln. 5	-	0.05 mL	0.25 mL	0.50 mL	0.75 mL
total volume	5.00 mL	5.00 mL	5.00 mL	5.00 mL	5.00 mL