Sistema per la purificazione delle acque di vegetazione degli oleifici

(S.P.A.V.O.)

(P.S.R. del Veneto, n.745 del 15/3/2010, Misura 124, NS domanda n. 1811124)

Relazione finale sintetica

Parole chiavi: purificazione acque, acque di vegetazione; laccasi; mediatori; sensori elettrochimici, polifenoli, fenoli, induttori di espressione; ossidazioni enzimatiche.

Partner

(R): Università degli Studi di Padova (Capofila) (R); *Responsabile scientifico Dr. Maria Luisa Di Paolo (Dipartimento di Medicina Molecolare)*

(P1) Frantoio Colli del Poeta s.a.s. – di Carli Donaudy Daria, Ottolitri Luciano & C *(Arquà Petrarca, PD)*

(P2) Associazione Interregionale Produttori Olivicoli (AIPO) *(Verona)*

Motivazioni del progetto

La produzione dell'olio di oliva genera rilevanti quantità di acque di lavorazione (AV), altamente tossiche. La frazione organica, responsabile dell'elevato "Chemical Oxygen Demand" (C.O.D.), include composti fenolici (5-25 g/L), che sono fra i principali responsabili degli effetti fitotossici ed antimicrobici delle AV. Per ridurne la tossicità e facilitare lo smaltimento delle AV nei sistemi di depurazione fognaria e/o l'impiego nella produzione di biogas, il progetto SPAVO si è posto i seguenti obiettivi:

1. Sviluppare un processo semplice e tecnicamente realizzabile per l'abbattimento dei polifenoli nelle acque di vegetazione dei frantoi. Questo processo si doveva basare sull'utilizzo di laccasi, enzimi in grado di degradare i polifenoli (PF).
2. Mettere a punto due prototipi di bio-sensore per il monitoraggio del processo enzimatico:

a) un sensore per il dosaggio attività delle laccasi, prodotte da funghi e rilasciate nei loro brodi di coltura;

b) un bio-sensore per il dosaggio dei polifenoli nelle acque di vegetazione, da monitorare durante il trattamento enzimatico.

Le attività svolte ed i risultati ottenuti sono di seguito riassunte.

A1) Produzione di laccasi da colture di funghi

Questa attività è stata finalizzata a far produrre, a funghi del "marciume bianco" (*Trametes versicolor,*Tv, *Trametes trogii,* Tt e *Pleurotus ostreatus,* Po), elevate quantità enzimi con attività laccasica (enzimi in grado di ossidare i polifenoli) da utilizzare per il trattamento enzimatico delle AV.

I principali fattori valutati per massimizzare la produzione di laccasi da parte dei funghi sono stati:

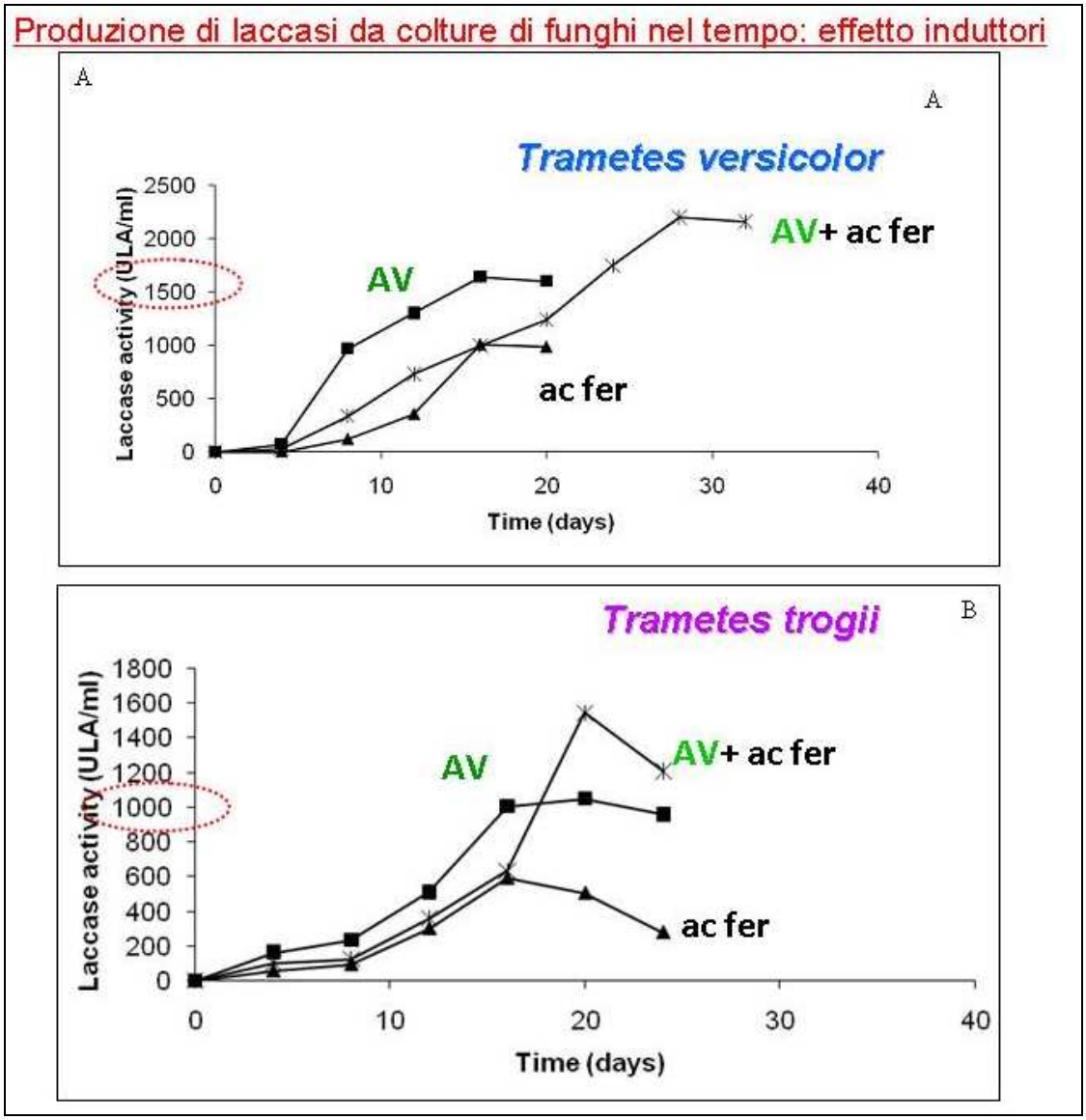
- ✓ tempo di espressione di attività laccasica e concentrazione iniziale di spore;
- ✓ effetto di induttori di espressione;
- ✓ riciclo del micelio del fungo.

L'attività laccasica rilasciata nel brodo di coltura è stata misurata con il metodo standard della siringaldazina, substrato specifico per le laccasi (attività espressa come "Unità di attività laccasica" in una unità di volume di brodo, ULA/ml).

Per indurre i funghi a produrre e rilasciare gli enzimi con attività laccasica, è necessaria la presenza, nel brodo di coltura, di sostanze definite "induttori". Oltre al rame, **gli induttori** polifenolici

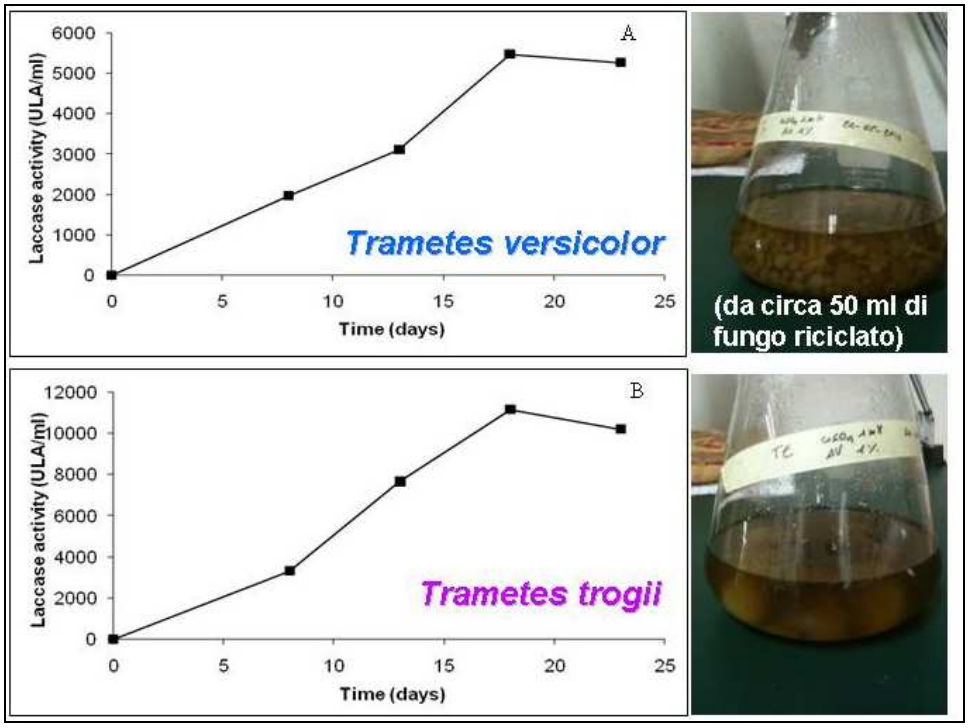
utilizzati sono stati: l'acido ferulico (induttore standard) e le acque di vegetazione, miscela naturale, ricca in polifenoli e disponibile a "costo zero". **La più elevata e rapida produzione di laccasi** è stata ottenuta con i funghi *Trametes*, in presenza **di AV intere** (1% in volume nel brodo di coltura), come da Fig A1.1

Figura A1.1 *Effetto della combinazione dei vari induttori polifenolici* (AV; AV + acido ferulico; acido ferulico) sulla produzione di laccasi da *Trametes versicolor* e *Trametes trogii*.



Dal confronto di Fig. A1.1 con Fig. 1.2, si può vedere che **con il riciclo del micelio del fungo**, già "attivato" alla produzione di laccasi, si ottiene una rapida ed elevata produzione di laccasi (più del triplo di quella ottenuta partendo da spore).

Figura A.1.2 *Produzione di laccasi da funghi riciclati*



Risultati principali di questa attività:

1. **Sono stati messi a punto i protocolli per la produzione di brodi con elevata attività laccasica.** I brodi di ***T. versicolor*** **hanno una** ***attività laccasica specifica*** **(ULA/mg proteina),** significativamente maggiore rispetto a quella dell'enzima commerciale e rispetto a quella dei brodi da *Trametes trogii* e *Pleurotus ostreatus*.
2. **Tempi di produzione di laccasi**: partendo dalle spore, la massima produzione di enzimi con attività laccasica si raggiunge dopo **15 giorni di crescita**.
3. **Induttori: le AV,** ottenibili a costo zero dall'attività dei frantoi (solo eventuali spese di stoccaggio), sono **ottimi induttori** e consentono di ottenere un'elevata la produzione di enzimi con attività laccasica da diversi funghi; sono migliori dell'acido ferulico, più economici ed il loro utilizzo consente un "recupero" di sostanze di rifiuto (AV).
4. **Il riciclo del micelio del fungo già "attivato"** è possibile e consente di ottenere brodi con più elevata attività laccasica in minor tempo rispetto a quello richiesto dalle colture inoculate con spore.
5. La **laccasi indotta da AV** in *Trametes versicolor*, ha un'**affinità (**Km) simile a quella dell'enzima commerciale per la siringaldazina (substrato standard) (Km ≈2µM) ed per il p-idrossitirosolo (caratteristico polifenolo delle AV) (Km ≈300µM), e quest'ultima è confrontabile con quella per le AV complete (miscela di numerosi polifenoli/substrati).

A2) Sviluppo di 2 prototipi di biosensori per il monitoraggio della laccasi e dei fenoli

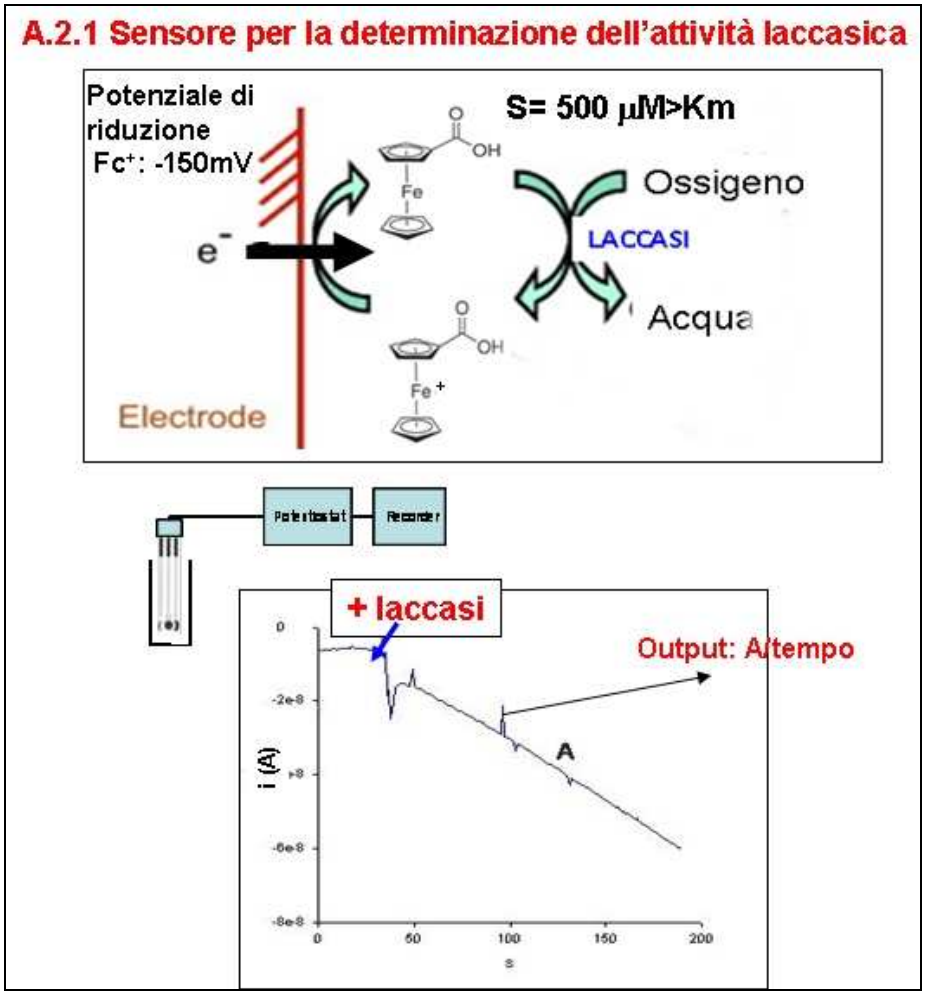
Sono stati sviluppati 2 metodi che utilizzano un sensore elettrochimico (il G-Sensor):

1) per la determinazione dell'attività laccasica presente in un brodo di coltura (il SENS-LAC);
2) per la determinazione della quantità di PF nelle AV (il SENS-PF).

A.2.1 Sensore per la determinazione dell'attività laccasica nei brodi di coltura dei funghi (SENS-LAC)

Il SENS-LAC (Fig. A2.1) misura la concentrazione di laccasi in base alla velocità alla quale si forma il "prodotto di reazione" del ferrocene monocarbossilico, derivante dall'attività enzimatica. In condizioni "saturanti" di substrato (ferrocene monocarbossilico), la velocità della reazione enzimatica dipende solo dalla concentrazione di laccasi attiva nel campione. Applicando un potenziale di -150 mV all'elettrodo di lavoro, il ferrocinium prodotto dalla laccasi si riduce generando un segnale in corrente (output del sensore: nA/min).

Fig. A.2.1. *Schema di lavoro del sensore per la determinazione dell'attività laccasica (SENS-LAC).*

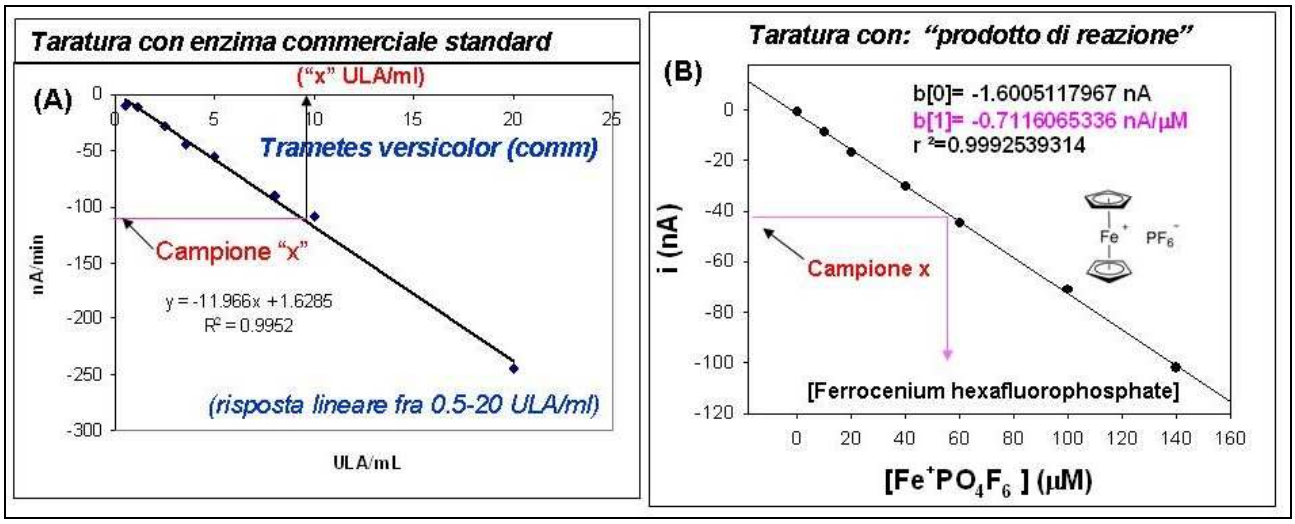


Mediante una specifica retta di taratura con il ferrocenium esafluorofosfato, il segnale in corrente del SENS-LAC (nA/min) è convertito in quantità di attività laccasica, espressa come **µM $_{prodotto}$/min (o nmol $_{prodotto}$ /min** in un **ml di soluzione).**

I risultati ottenuti con il **SENS-LAC** hanno dimostrato:

- la linearità della risposta del sensore in funzione della concentrazione di laccasi (mg/ml) e del prodotto di reazione (Fig. A2.2 B)
- una correlazione lineare fra l'attività misurata con il SENS-LAC e l'attività misurata con il test standard della siringaldazina (Fig A 2.2A);
- il limite minimo determinabile di laccasi è di 0.5 ULA/ml nel volume di saggio.

Figura A2.2 *Linearità della risposta del SENS-LAC alla concentrazione di laccasi (A) ed al prodotto di reazione (B)*



Il SENS-LAC è stato validato ed applicato per la determinazione dell'attività laccasica nei brodi di coltura di funghi .

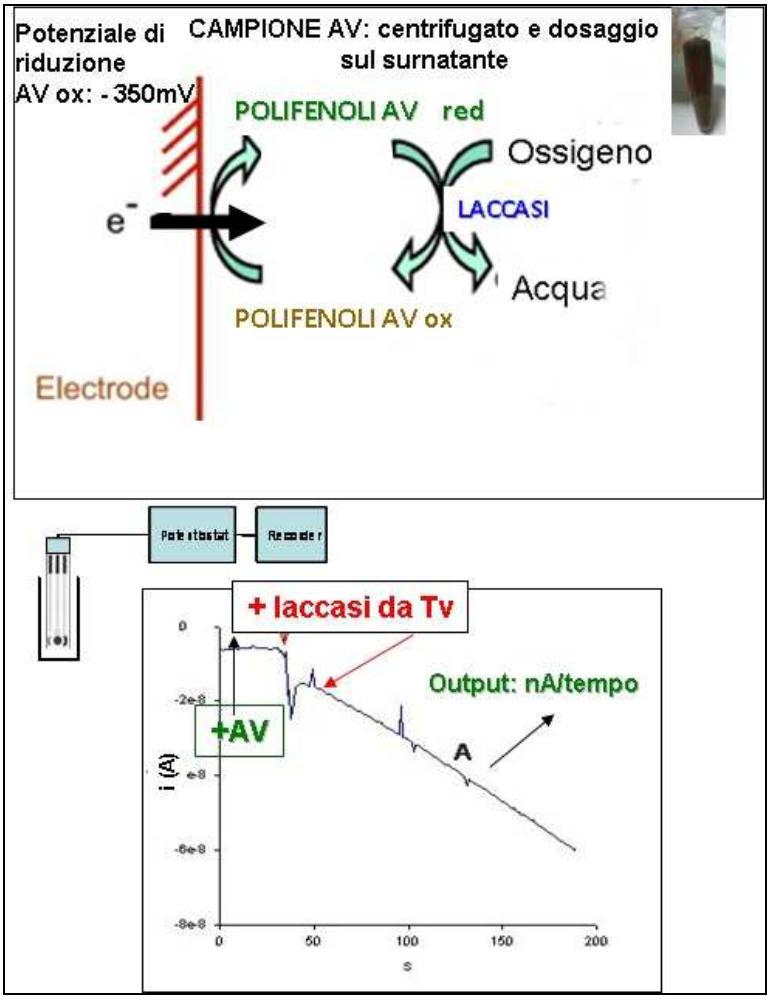
Una misura di attività laccasica con il SENS-LAC richiede circa 10 minuti; le tarature sono ben riproducibili nel tempo. Le ridotte dimensioni della strisciolina (G-sensor o "strip") sulla quale sono stampati i 3 elettrodi della cella elettrochimica (circa 1 x 3 cm), consenteno misurazioni in un volume di saggio di 1 ml e quindi un utilizzo di volumi molto ridotti sia di reagenti e che di campione.

A2.2 Bio-sensore per il monitoraggio dei PF nelle AV durante il trattamento con laccasi (SENS-PF)

Il principio su cui si basa il metodo del SENS-PF è illustrato in Figura A 2.3: molti polifenoli presenti nelle acque di vegetazione, sono substrati della laccasi (addizionata, come bio-elemento, al

tampone di saggio) ed i loro prodotti di reazione (polifenoli ossidati) possono essere misurati all'elettrodo di lavoro del sensore, applicando un potenziale di lavoro di -350 mV.

Figura A.2.3 *Schema di lavoro del sensore per la determinazione dei polifenoli (SENS-PF).*



Per poter mettere a punto il metodo per questo sensore, sono stati necessari studi preliminari volti a:

a) valutare l'attività della laccasi su PF standard presenti in quantità significative nelle AV;
b) valutare la risposta elettrochimica dei PF standard e delle AV.

Come polifenoli standard e rappresentativi delle AV sono stati utilizzati: il p-idrossitirosolo, l'oleouropeina (suo precursore), il tirosolo, l'acido caffeico, il ferulico, l'acido siringico e la luteolina; come laccasi standard per eseguire il saggio è stata utilizzata quella commerciale da *Trametes versicolor*. Come AV, sono stati utilizzati da campioni forniti dai partner P1 e P2, preliminarmente centrifugati per eliminare la frazione particolata..

Sui polifenoli standard è stata determinata:

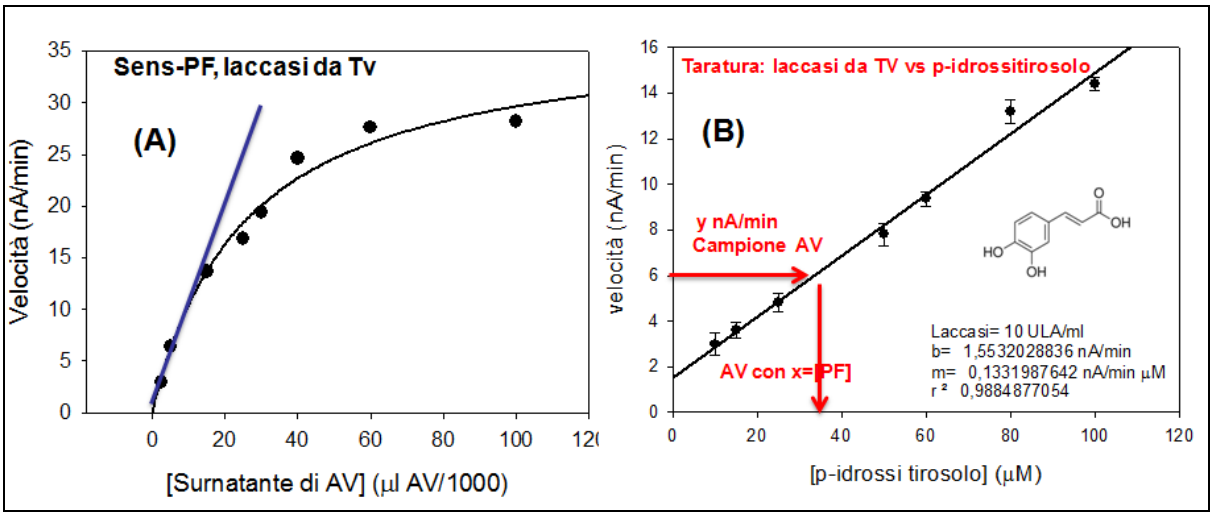
- la capacità di essere ossidati dalla laccasi (si è misurato il consumo di ossigeno della laccasi)

- la risposta elettrochimica, in presenza ed assenza di laccasi (utilizzando il SENS-PF).

Gli studi elettrochimici hanno dimostrato che molti polifenoli standard ossidati da laccasi, possono essere ridotti all'elettrodo di lavoro: in presenza di laccasi, il segnale generato (in nA/min) dipende dalla concentrazione di "polifenoli ridotti" presenti nel campione.

La risposta del sensore elettrochimico alle AV è lineare nell'intervallo di diluizioni di AV da 1/300 a 1/50 (equivalente ad un massimo di circa 0.08 mg/ml di PF misurati con il metodo di Folin-Ciocalteu) (Fig. A 2.4).

Figure A.2.4 *Risposta del sensore elettrochimico ai PF delle AV (A) e taratura del SENS-PF con p-idrossitirosolo.* Le misure sono state condotte utilizzando 10 ULA/ml di laccasi da Tv, in condizioni standard.



Per calcolare concentrazione di PF in un campione di AV è necessario utilizzare una retta di taratura eseguita con lo standard p-idrossitirosolo, che consente di convertire il segnale da nA/min ad equivalenti di p-idrossitirosolo (in µM, Fig. A2.4B). Il p-idrossitirosolo è stato scelto come standard in quanto è uno dei PF più concentrati presenti nelle AV ed ha ottima risposta elettrochimica.

Il metodo del SENS-PF è stato validato utilizzandolo per monitorare la concentrazione dei polifenoli in AV durante i trattamenti di "purificazione" con laccasi (Attività 4) e la sua risposta è stata confrontata con quella dei metodi standard per i PF, il *Folin-Ciocalteu* (FC) ed il *Test della capacità riducente del ferro* (FRAP).

I tre metodi danno la stessa risposta per quanto riguarda i valori delle costanti cinetiche di ossidazione dei PF, che rappresentano la velocità di abbattimento dei PF in campioni di AV. Diversamente, si evidenzia una discrepanza tra i valori assoluti delle concentrazioni dei PF determinati con il SENS-PF rispetto quelli determinati con i metodi FC e FRAP, che peraltro differiscono fra loro. I metodi FC e FRAP sovrastimano il contenuto in PF, in quanto rilevano anche

altre sostanze ridotte, ad esempio zuccheri, ammine, che non sono substrati di laccasi. Il SENS-PF è più specifico, poiché sfrutta la specificità del bio-elemento (laccasi) per i PF delle AV.

A 3) Processo di abbattimento dei fenoli delle AV mediante laccasi – scala laboratorio

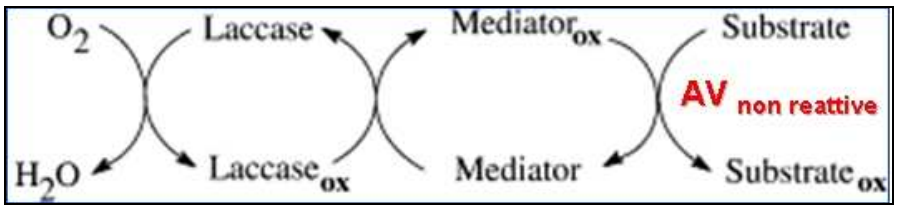
Per mettere a punto il processo enzimatico di abbattimento dei PF nelle AV, si è dapprima condotto uno studio su scala di laboratorio, utilizzando piccoli volumi di AV.

Sono state condotte diversi tipi di prove finalizzate ad individuare le condizioni ottimali per massimizzare l'abbattimento (ossidazione) dei PF, nel minor tempo possibile.

I parametri modificati per trovare le condizioni ottimali sono stati:

1. Tipo di laccasi (sono state utilizzate le laccasi da Tv, Tt e Po e quelle ottenute da attività 1)
2. Quantità di laccasi (variata fra 80 -5000 ULA in 1 ml di AV)
3. Durata del trattamento enzimatico(da 2 a 48 ore)
4. Quantità di ossigeno (10-100%)
5. Effetto di mediatori, cioè piccole molecole fungono da "navetta" trasportatrice di elettroni fra substrati non ossidabili direttamente dalla laccasi e la laccasi stessa, come riportato nello schema di Figura A.3.1.

Figura A.3.1 *Meccanismo di funzionamento di un mediatore della reazione della laccasi verso substrati difficilmente ossidabili.*



6. Temperatura (fra 10-25°C).

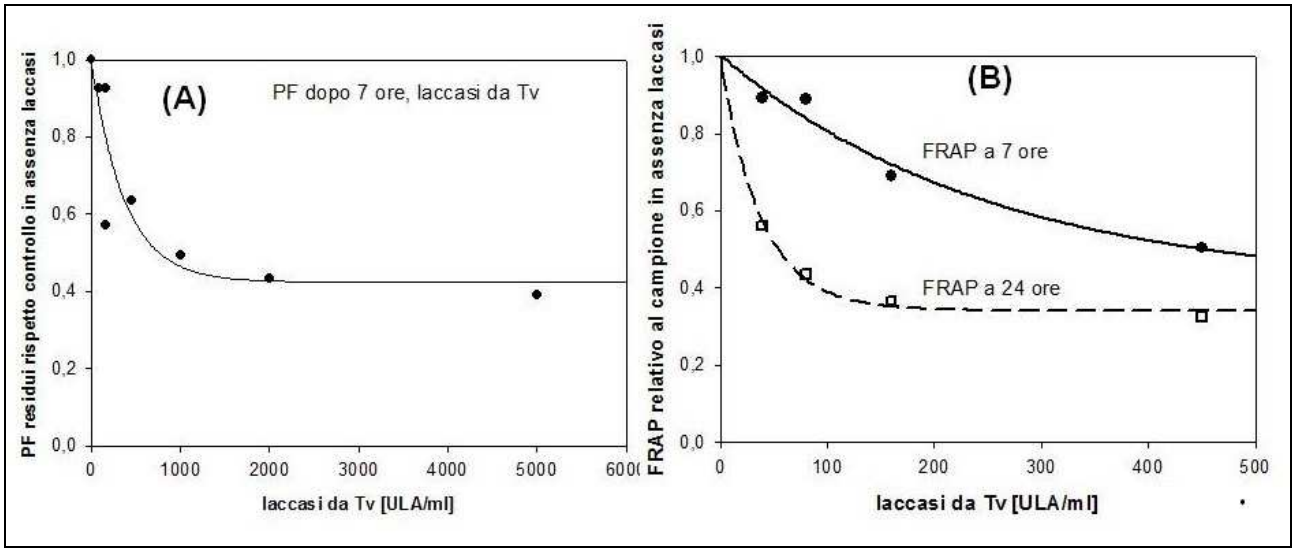
Preliminare a tale attività è stata la messa a punto della procedura **di estrazione dei PF dalle AV** per il loro dosaggio, un passaggio che si è rivelato molto critico, in quanto, nella frazione particolata delle AV (circa il 20% del volume totale) sono presenti PF poco solubili in acqua, ma estraibili, almeno in parte, utilizzando una miscela di etanolo acido.

I risultati ottenuti dagli esperimenti pilota **hanno dimostrato che:**

1. Le laccasi da *Trametes versicolor*, da *Trametes trogii* e da *Pleurotus ostreatus* hanno la stessa affinità per i PF nelle AV e le ossidano con velocità simili.

2. In seguito a trattamento con laccasi, la concentrazione dei PF diminuisce fino ad un valore minino, ma non va a zero (con il metodo FC); la massima riduzione si ottiene con una quantità di laccasi variabile fra 500-1000 ULA/ml (esempio in Fig. A3.2).

Figura A.3.2 *Effetto della concentrazione di laccasi (A) e del tempo (B) sul decadimento dei PF in AV intere, in presenza di laccasi a T=10°C.*



3. A parità di quantità di laccasi, l'ossidazione dei PF in AV è tempo dipendente e la quantità di PF ossidati è massima dopo 24 ore.
4. Aumentando la concentrazione di ossigeno, la velocità di ossidazione dei PF aumenta. L'ossigenazione è quindi un fattore critico ed importante nella realizzazione del trattamento enzimatico.
5. Fra una decina di possibili mediatori, l' acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico (ABTS) addizionato alle AV ([ABTS]/$[PF]_{AV}$=1/1000), in presenza di laccasi, aumenta di circa il 30% la quantità dei PF ossidabili dall'enzima (Fig A 3.3).
6. Il sistema enzimatico è efficace anche a 10°C (Fig. A3.4), cioè alle temperature durante il periodo della molitura (10-18°C all'interno nel frantoi e nelle cisterne interrate).

E' stato inoltre verificato che il trattamento enzimatico con laccasi ed ABTS è efficace nell'ossidazione dei PF presenti anche nella frazione particolata

Figura A 3.3 *Effetto di ABTS come mediatore dell'attività laccasica sui polifenoli di AV.*L'aggiunta di ABTS alla reazione ormai ferma, determina una ripresa dell'ossidazione dei PF residui e cioè, una ripresa del consumo di ossigeno (metodo ossigrafico).

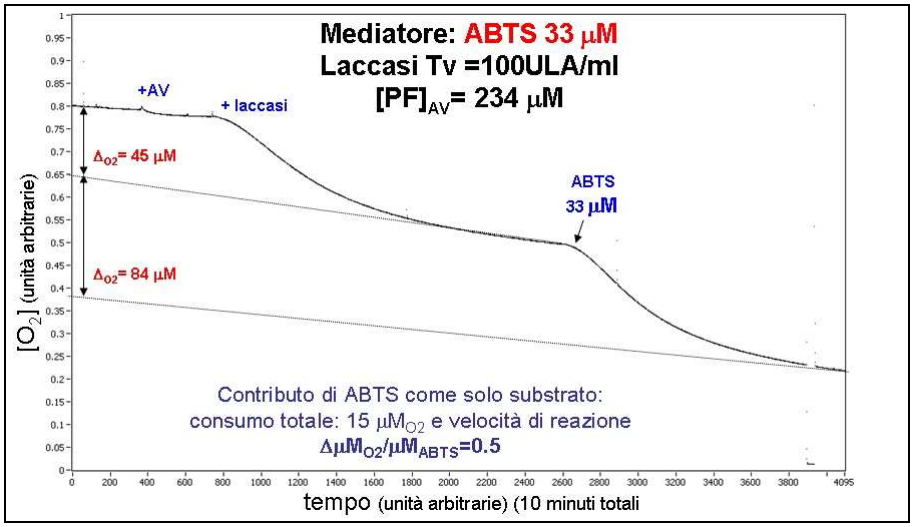
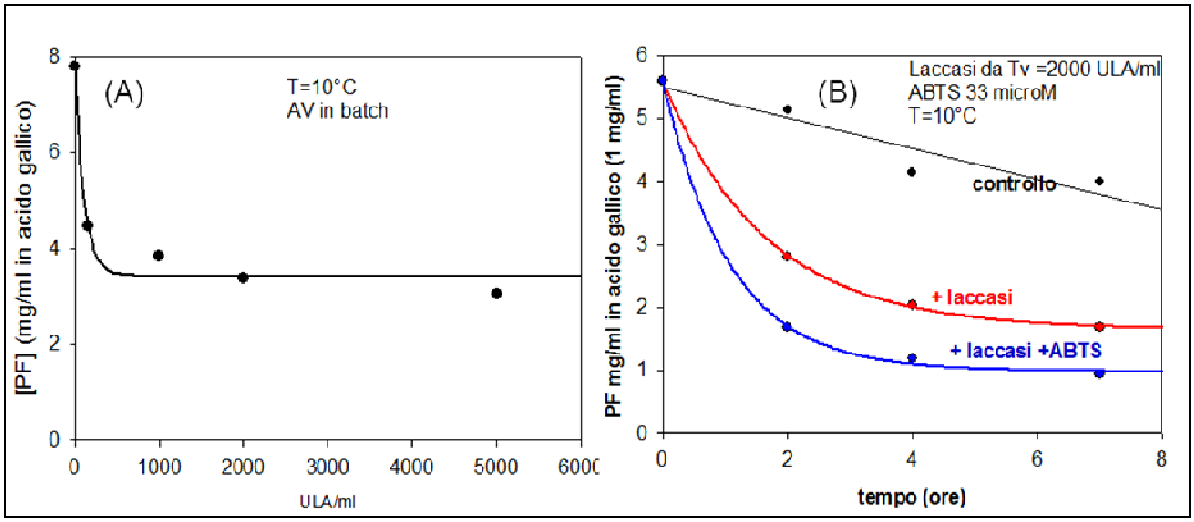


Figura A 3.4 *Sistema enzimatico e AV: prove a 10°C, in batch.*

A) Effetto della concentrazione di laccasi dopo 24 ore di trattamento; B) effetto del tempo sul trattamento con laccasi 2000 ULA/ml, laccasi+ABTS 33 µM; controllo senza sistema enzimatico.



La sperimentazione condotta **su scala di laboratorio** ha consentito di definire le condizioni sperimentali da provare su scala più grande, con un piccolo impianto pilota.

In particolare il trattamento enzimatico può essere condotto alle seguenti condizioni:

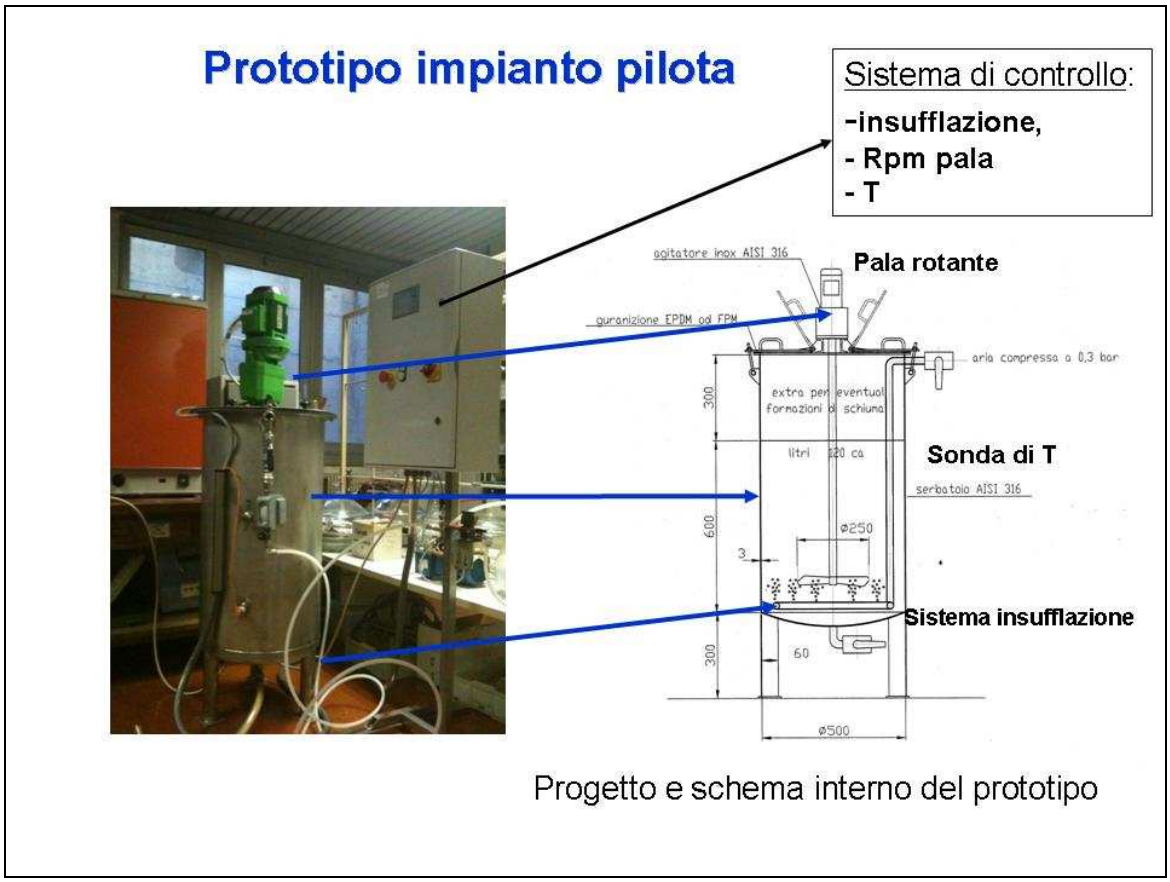
- laccasi da Trametes *versicolor*, a circa 600 ULA/ml
- mediatore ABTS 33 µM

- T=10-25°C
- durata del trattamento: 24 ore
- il sistema deve essere ben ossigenato.

A4) Processo di abbattimento dei polifenoli delle AV mediante laccasi, scala impianto pilota

Il sistema enzimatico di abbattimento dei PF nelle AV messo è stato validato utilizzando un piccolo impianto pilota (prototipo in Fig. A4.1).

Figura A.4.1 *Progetto e realizzazione del prototipo dell'impianto*



Il prototipo è stato progettato in acciaio, può contenere volume di AV di 120 litri ed è stato dotato di un sistema di insufflazione di aria (con relativo controllo) e di una pala rotante (a velocità variabile) per favorire il mescolamento e l'ossigenazione delle AV. Il prototipo è stato inoltre dotato di una sonda per monitorare la temperatura durante il processo, e sul fondo è stato posizionato uno scarico dal quale è stato possibile fare dei campionamenti per monitorare il processo. Le AV sono state conferite dal Frantoio di P1.

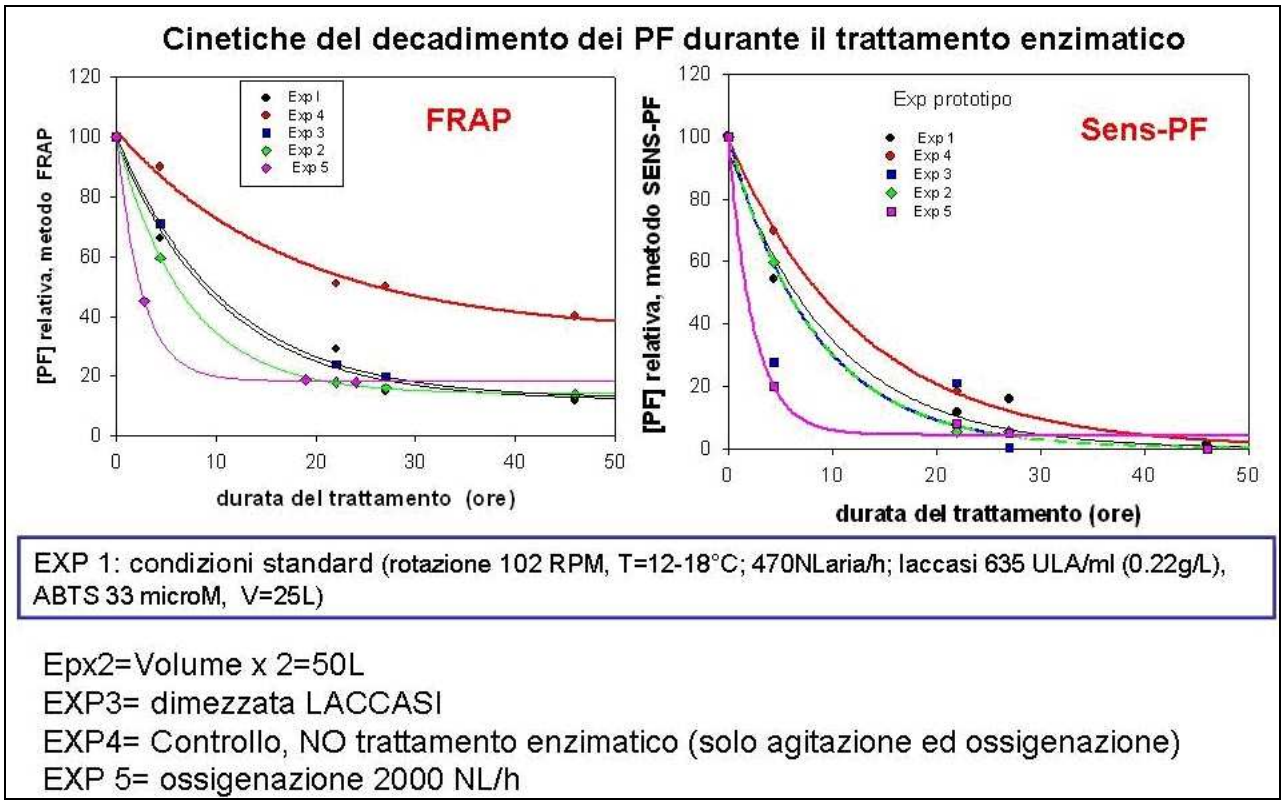
Gli esperimenti sono stati condotti variando alcuni parametri, come il volume di AV trattate (25-50L), la quantità di laccasi da Tv aggiunta (da 0 a 635 ULA/ml) e la quantità di aria insufflata (da 470 a 2000 NL/h), a parità di velocità di mescolamento, T (fra 12 e 18°C) e concentrazione di mediatore (ABTS 33 µM). Il trattamento è stato monitorato per 48 ore complessive.
L'attuazione del processo con il prototipo si è dimostrata semplice, come illustrato in Fig. A.4.2.

Figura A.4.2 *Modalità di utilizzo dell'impianto pilota.*

In Fig. A4.3 sono riportate alcuni esempi delle cinetiche di diminuzione (ossidazione) della concentrazione dei PF.
I risultati ottenuti evidenziano come il trattamento enzimatico aumenta, rispetto al solo trattamento di ossigenazione, la velocità di ossidazione dei PF: il valore di costante cinetica di ossidazione dei PF aumenta con sia la concentrazione di laccasi, che con il flusso di aria (aumentando cioè l'ossigenazione). E' confermato un buon accordo fra i valori delle costanti cinetiche di decadimento dei PF ottenute con i diversi metodi di misura (FC e FRAP e SENS-PF).

Il trattamento enzimatico protratto per 24 ore determina una diminuzione di circa 80-95% dei PF.

Figura A 4.3 *Decadimento dei PF in AV trattate in prototipo in diverse condizioni sperimentali*



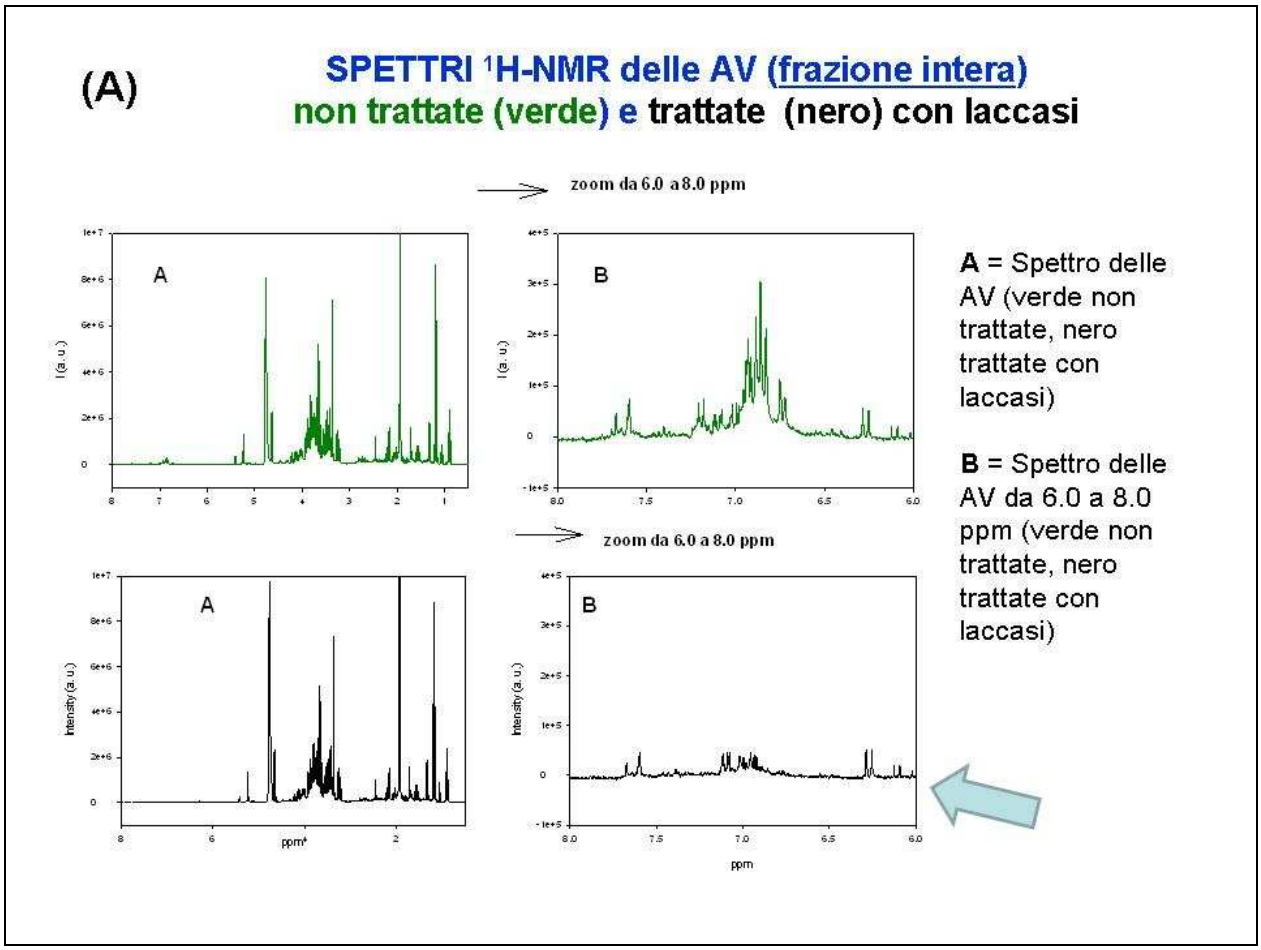
Per capire l'effetto del trattamento enzimatico sui PF in AV, campioni di AV trattate nel prototipo e campioni non trattati, sono stati analizzati mediante tecniche spettroscopiche.

Nella Fig. A 4.4 A sono riportati gli spettri ^{1}H NMR delle acque di vegetazione intere al tempo zero (T0) e quelle trattate con il sistema enzimatico per 24 ore (T3).

Dalle analisi degli spettri spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) è stato possibile trarre le seguenti conclusioni:

- ✓ I picchi NMR che tendono a scomparire nelle AV trattate con laccasi, (zona spettrale a 7.3-6.6 ppm) sono attribuibili ai polifenoli ;
- ✓ alcuni di questi picchi, "sensibili" al trattamento con laccasi, sono: **l'idrossitirosolo, il tirosolo e l'oleuropeina**, presenti a concentrazioni mM, ed altri polifenoli, es. acido caffeico, presenti a concentrazioni minori (sub-millimolari).
- ✓ L'utilizzo del mediatore (ABTS) permette l'abbattimento anche del tirosolo, polifenolo che, se utilizzato da solo, è ossidato molto lentamente della laccasi da Tv.

Figura A 4.4 *Esempi di Spettri ^{1}H NMR su AV*
Confronto AV (non trattate, T0) con AV dopo 24 ore di trattamento enzimatico con prototipo.



Conclusioni delle prove con impianto pilota:

- ✓ è stata ottenuta un'ottima riproducibilità dei risultati ottenuti su scala "laboratorio";
- ✓ il sistema enzimatico (laccasi+ABTS) abbatte i PF a circa il 5-20% del valore iniziale, valore che dipende dal metodo di dosaggio;
- ✓ il sistema enzimatico agisce sicuramente sui polifenoli presenti in maggior concentrazione nelle AV, quali idrossitirosolo, oleuropeina, tirosolo, ma anche su molti altri, meno concentrati.

A5) Valutazione delle proprietà batteriostatiche e fitotossicità residua delle AV

Per valutare l'effetto del trattamento enzimatico sulla bio-tossicità delle AV, sono stati eseguiti i seguenti test, confrontando gli effetti delle AV trattate e di quelle non trattate:

1. Test di fitotossicità (Test di Germinazione con *Lepidium sativum*)
2. Test di micro-tossicità (Vitalità su *Daphnia magna);*
3. Test di Biometanizzazione e Tossicità su batteri anaerobi
4. Test del COD

Tabella A5.1 *Dati riepilogativi dei 4 test di tossicità sulle AV trattate con il sistema enzimatico*

Test		**AV Controllo**	**AV+ Laccasi, ABTS, O_2 Trattato**	**Effetto del trattamento enzimatico**
Germinazione, *Lepidium sativum*	G.I. % (AV 10%)	36.4	67.8	+
Microtossicità, *Daphnia magna*	diluizione	210	197	=
Inibizione dei batteri anaerobi Gram (+)		si	No	+
Inibizione dei batteri anaerobi Gram(-)		no	No	=
Biometanizzazione	NL/Kg s.s.	123	419	+
C.O.D	g/L	183	180	=
FC	g/L	4.45	1.76	+
FRAP	mM	30.9	5.34	+
Sens-PF	mM	2.71	0.38	+

Dai risultati riepilogati in Tabella A 5.1, si può vedere che la riduzione dei PF attuata mediante il trattamento enzimatico, determina:

1) una diminuzione della fitotossicità delle AV (se diluite al 10% in acqua);

2) la scomparsa dell'inibizione della crescita dei batteri anaerobi coinvolti nei processi fermentativi;

3) un aumento del biogas ottenibile dalle AV.

Diversamente, il trattamento enzimatico non riduce né il COD né la micro-tossicità delle AV intere, suggerendo che la loro tossicità ed il COD siano dovuti a molteplici fattori e differenti composti organici ed inorganici presenti nel campione, inclusi verosimilmente anche i polifenoli ossidati.

A6) Attività di coordinamento, informazione, divulgazione dei risultati e loro trasferibilità

Il coordinamento delle informazioni" è stato finalizzato a garantire lo scambio d'informazioni tecniche e tecnologiche tra settore produttivo (oleifici) e Centro di ricerca (R), necessario per realizzare gli obiettivi progettuali.

La divulgazione ed il trasferimento dell'iniziativa e degli esiti tecnologici della ricerca hanno trovato un buon accoglimento e gradimento da parte delle Amministrazioni pubbliche e dei numerosi

frantoiani contattati, nei quali è stata suscitata un'attesa fortemente interessata per i risultati della ricerca.

Conclusioni e proposte

L'attività di ricerca e la sperimentazione svolta hanno consentito di realizzare gli obiettivi specifici previsti:

- è stato messo a punto il processo enzimatico che è in grado di abbattere il contenuto dei polifenoli nelle acque di vegetazione (al 5-20% residuo) e testato in un impianto pilota;
-sono state messe a punto le condizioni di coltura di funghi del marciume bianco per far produrre ai funghi elevate quantità di laccasi, proponendo le acque di vegetazione come induttori a costo "zero" e con potenziale beneficio ambientale per il riciclo di un "rifiuto";
- è stato messo a punto il metodo del SENS-LAC per quantificare l'attività laccasica nei brodi di coltura;
-è stato messo a punto il metodo del SENS-PF, che utilizza il sensore elettrochimico accoppiato ad un sistema enzimatico specifico per la determinazione dei polifenoli nelle AV e ne esprime la concentrazione in equivalenti di p-idrossitirosolo.

I dati di fitotossicità e micro tossicità hanno però messo in luce che, allo stato attuale, il solo metodo enzimatico sulle AV intere non è sufficiente a consentirne lo smaltimento diretto nella rete fognaria. Il trattamento enzimatico consentirebbe invece il recupero come biomassa delle AV trattate, in particolare della frazione particolata.

Nello sviluppo progettuale si è così considerato di poter superare il problema dello smaltimento nella rete fognaria usufruendo anche di azioni meccaniche sulla massa liquida. Andando ad impiegare diversi macchinari, già in uso negli oleifici, si è valutata la possibilità di limitare il carico inquinante delle AV attuando:

a) la separazione del particolato, 17-20% del totale refluo (utilizzabile come biomassa);
b) il trattamento enzimatico della frazione liquida residua (con un ridotto carico PF e di organico e quindi di COD e BOD), per valutarne poi, previo un'eventuale ulteriore trattamento fisico/chimico in serie, lo smaltimento in fognatura.

I risultati ottenuti da questo progetto potranno essere trasferiti al sistema economico per creare nuove aziende bio-tecnologiche (per la produzione di laccasi e dei SENS-PF e SENS-LAC) e figure professionali.

La produzione di enzimi con attività laccasica è, infatti, multifunzionale e, oltre al settore oleario, può trovare applicazione nell'industria grazie alle innumerevoli applicazioni di questi enzimi, in industrie chimiche (per realizzare processi chimici e conseguire uno sviluppo industriale sostenibile) e altre aziende che impiegano laccasi come additivi per sbiancare e degradare composti naturali e di sintesi. Il SENS-LAC, potrebbe quindi essere trovare impiego sia in aziende che producono che in quelle che utilizzano la laccasi per scopi industriali. Il SENS-PF, grazie alla specificità del suo bio-elemento, potrebbe invece essere utilizzato per valutare il contenuto dei PF nelle AV prodotte nei frantoi in diverse condizioni, per monitorane il contenuto di PF ed, in base a questo, valutarne le possibili destinazioni e trattamenti.