

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES CATALÍTICAS DE LAS PROTEASAS BACILLUS SUBTILIS

STUDY OF THE CATALYTIC PROPERTIES OF BACILLUS SUBTILIS PROTEASES

Grebeshova¹ R, Castellanos² O, Salcedo³ L.

RESUMEN

Se investigaron las propiedades catalíticas de las proteasas obtenidas del filtrado de cultivo de la bacteria *Bacillus subtilis*. Utilizando inhibidores específicos de proteasas se determinó que las proteasas presentes en el filtrado pertenecían al grupo de las serina proteasas. Se utilizó ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) como inhibidor de metaloproteasas, y fenilmetilsulfonil fluoruro (FMSF) como inhibidor de serina proteasas. La actividad proteolítica fue altamente estable en soluciones alcalinas y a altas temperaturas, además tolero la presencia de detergentes. Se propone que estas proteasas sean utilizadas en calidad de biocomponente para la producción de detergentes.

Palabras claves : *Bacillus subtilis*, protease alcalina, serina proteasa, biodetergente

SUMMARY

The catalytic properties of proteases isolated from the filtrate of submerged fermentation of *Bacillus subtilis* were investigated. Proteases present in the filtrate were determined to be of the serine protease type based on the use of specific protease inhibitors; ethylene-diamintetraacetic acid (EDTA) was used as a metalloprotease inhibitor, and phenyl-methylsulfonyl fluoride (PMSF) was used as a serine protease inhibitor. Protease activity was highly stable in alkaline solutions and at high temperatures as well as in the presence of detergents. We propose that this protease preparation be used as biocomponent in detergent production.

Keywords: *Bacillus subtilis*, alkaline protease, serine protease, biodetergent.

INTRODUCCIÓN.

En la actualidad las proteasas de origen microbiano son empleadas amplia y exitosamente en diferentes procesos de producción: en la industria pesquera y frigorífica (Nicolas, 1995), en la producción de pegantes (Christensen & Donelyan, 1990), en el tratamiento de rollos cinematográficos y de fotografía para la regeneración de la plata (Krysteva et al, 1987), en la elaboración de productos cosméticos y farmacéuticos (Patente JP07265075, 1995), en la producción de proteína unicelular, de concentrados proteicos para animales y alimentos para el hombre como queso y sustitutos lácteos. En la industria del cuero encuentra su particular empleo para la eliminación del pelo residual o depilación y el ablandamiento y humectación del curtido (Patente JP07236482, 1995). Los preparados enzimáticos superconcentrados y purificados encuentran u aplicación en la medicina para la elaboración de medios de diagnóstico, sueros curativos y vacunas (Patente US-396521, 1990; Patente JP07155182, 1995).

La mayor demanda de preparados proteolíticos está relacionada con la producción de biodetergentes o detergentes con componentes enzimáticos (Christensen & Donelyan, 1990; Misset, 1993; Patente JP07265075, 1995). En estos casos en calidad de componente biológico es añadida una porción de proteasa alcalina, lo cual permite incrementar la efectividad de los detergentes en 35-40%, particularmente cuando la limpieza del tejido se hace de manchas proteicas (manchas de sangre, cacao, leche, salsas, huevo, y otros), disminuyendo el consumo de sustancias tensoactivas (STA) y mejorando los aspectos ecológicos de este proceso.

¹DSc. Laboratorio de Microbiología Industrial. Instituto de Biotecnología. Moscú. Federación de Rusia.

²PhD. Docente. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Colombia. Sede Santafé de Bogotá.

³ PhD. Docente. Universidad Pedagógica Nacional.

En el presente artículo son estudiadas las propiedades catalíticas del preparado enzimático obtenido del *B. subtilis* con el objetivo de determinar su posible adaptación en diferentes procesos industriales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características del microorganismo usado como productor de la enzima

El estudio de las propiedades catalíticas se realizó usando un preparado enzimático, obtenido después del cultivo en sumergido de la bacteria *B. subtilis*. Este microorganismo fue tomado de la colección de cepas del Instituto de Biotecnología de la Federación de Rusia y transformado hasta obtener un mutante estable usando sustancias químicas mutagénicas y métodos físicos. Se conservó en forma liofilizada a 4 C. La fermentación se llevó a cabo en erlenmeyer de 750 ml, teniendo como volumen efectivo 50 ml, a temperatura de 37 C y pH de 7.5, con una agitación de 180 rpm durante 48 h. Terminándose la fase de fermentación fue retirada la biomasa por medio de una centrifugación a 5000 g. El sobrenadante fue concentrado usando un secador al vacío y luego se trató con etanol (1:3,5 volumen de medio/volumen de etanol) a temperatura de 4 C.

Solución del preparado enzimático.

Se preparan soluciones del 1 % del preparado enzimático en bufer universal (ácido clorhídrico, ácido fosfórico y ácido bórico, todos al 0,1 N) al pH requerido, las cuales para su análisis fueron filtradas y centrifugadas a velocidades de 5000 g por espacio de 10 min. La disolución del preparado se lleva a cabo con agitación moderada sin calentamiento.

Determinación de las actividades catalíticas

La actividad proteolítica se determinó basándose en los resultados de la hidrólisis de la proteína de caseinato de sodio por el método de Anson modificado (Lipova, et al., 1973). La unidad de actividad proteolítica corresponde a la cantidad de enzima con la cual durante 1 minutos a 30 C, se forman productos correspondientes a 1 μ M de tirosina.

Las actividades de la elastasa y de la colagenasa se determinaron según el método de Soloviev (1966), la actividad lipolítica se determinó usando la metodología de Ota y Yamada (1966); la actividad de la amilasa se determinó por el método de Rujladieva (1976). Como inhibidor específico de la serina proteasa, correspondiente a la fracción alcalina, se usó el fenilmetilsulfonil fluoruro (FMSF), y el ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) como inhibidor de metaloproteasa, correspondiente a la fracción neutra.

Experimentos analíticos y cinéticos

Análisis cualitativo y cuantitativo. Los productos de la

hidrólisis de la caseína y la hemoglobina fueron analizados usando un secuenciador de aminoácidos "Hitachi". El efecto de los iones metálicos sobre la actividad catalítica de las enzimas fue determinada usando la concentración de los mismos en concentraciones de $5 \cdot 10^{-3}$ M - $1 \cdot 10^{-2}$ M (Dikson & Uebb, 1982).

Análisis de la estabilidad de las enzimas en función de la temperatura y el pH (Castellanos Et al, 1995). La termoestabilidad de las enzimas se determinó incubando la solución de enzima (el pH de la solución, el tipo de bufer y otras condiciones específicas dependen del tipo de enzima) durante 24 horas en un rango de temperatura de 20-60°C con intervalo de 10°C, determinando la actividad del preparado enzimático. De igual forma se procedió para determinar la estabilidad en función del pH, incubando a una temperatura dada las soluciones en un rango de pH de 6,0 hasta 11,0.

Temperatura y pH óptimos. Los valores óptimos de estos parámetros se determinaron llevando a cabo la medición de la actividad proteolítica, variando en un caso la temperatura en un rango de 20-60°C con intervalos de 5°C y en otro, variando el valor de pH en un rango de 2,0 hasta 9,0 en intervalos de 0,5.

Los resultados obtenidos son graficados tomando como variable dependiente el tiempo de incubación, para el caso del estudio de la estabilidad, y la temperatura o pH en el caso del estudio de los valores óptimos. La variable dependiente es representada en porcentajes, en donde 100 % se asume como el mayor valor obtenido de actividad para cada ciclo de experimentos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La especificidad enzimática del preparado hacia uno u otro tipo de sustrato se realizó determinando sus diferentes actividades catalíticas bajo condiciones estándares. En la tabla 1 se muestra la composición enzimática del preparado *B. subtilis* comparado con su similar, el preparado comercial Alcalasa ofrecido por la firma Novo Nordisk (Dinamarca), tomado como patrón de referencia por ser uno de los más usados en el mundo. Se encontró que ambos preparados tienen carácter complejo presentando actividad proteolítica a diferentes pH, así como actividad lítica. Particularmente el preparado *B. subtilis* manifestó actividad proteolítica muy significativa al ser medida bajo un pH de 9,5.

El preparado enzimático *B. subtilis* presenta no muy significativa actividad amilolítica y trazas de elastasa y colagenasa. En términos generales el preparado de *B. subtilis* contiene un espectro más amplio de

actividades enzimáticas, incluyendo amilolítica y lítica, aunque en referencia a las actividad proteolítica, la alcalasa lo supera levemente. Lo anterior es justificable ya que en el caso de la alcalasa se esta tratando con un producto comercial llevado a su estado final en la formulación, mientras el preparado *B.subtilis* esta aún sujeto a modificaciones en las etapas de fermentación y recuperación del preparado, antes de obtener el producto comercial.

Tabla 1. Especificidad catalítica de los preparados enzimáticos estudiados

| Actividad enzimática | Preparado enzimático <i>Bacillus subtilis</i> , U/g | Alcalasa, U/g (Novo_Nordisk) |
|----------------------|---|------------------------------|
| 1. Proteolítica | | |
| pH 2,5 | 10,6 | 0 |
| 5,5 | 28,0 | 34,0 |
| 7,5 | 32,0 | 30,0 |
| 9,5 | 123,0 | 152,0 |
| 11,0 | 102,0 | 136,0 |
| 12,0 | 24,0 | 28,8 |
| 2. Elastasa | 2,0 | 0 |
| 3. Colagenasa | 7,5 | 0 |
| 4. Lipolítica | 0 | 0 |
| 5. Amilolítica | 32,0 | 0 |

Nota: La unidad catalítica se define como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 1 μM de sustrato o para obtener 1 μM de producto a condiciones estándares, dadas por la metodología referenciada de temperatura y pH durante 1 minuto de reacción. En el caso de la actividad proteolítica la actividad se tomó al hidrolizar caseinato de sodio y determinar la cantidad de enzima requerida para obtener 1 equivalente de 1 mM de tirosina en un minuto de reacción a 30 C.

Por cuanto las proteasas neutras y alcalinas se distinguen entre sí por la estructura de sus centros activos, la utilización de inhibidores específicos permite determinar su proporción en el preparado (Fersht, 1984). Las proteasas alcalinas se caracterizan por tener en su centro activo una serina muy activa y por la acilación del grupo hidroxílico de la misma mediante la acción de inhibidores específicos tales como: fluorofosfato de diisopropilo, fenilmetilsulfonil fluoruro (FMSF) y otros compuestos. Para efectos de esta investigación se utilizó el FSMF. En el caso de la proteasas neutras, las cuales son metaloenzimas, se inhiben con sustancias capaces de unirse con el ion metálico existente en el centro activo de la enzima. Entre otros compuestos con capacidad inhibidora se pueden mencionar el ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), 8-oxifenolina, 1,10-fenantrolina. En este trabajo se estudió la fracción de proteasa neutra con ayuda del EDTA.

Como puede observarse de los resultados presentados en la tabla 2 al llevarse a cabo la inhibición selectiva por cada uno de los antes seleccionados compuestos de los centros activos del preparado *B.subtilis* se encontró que la fracción alcalina prevalece, haciendo parte del 77,3-81,0% del complejo enzimático.

Tabla 2. Relación de las fracciones alcalina y neutra de la proteasa en el preparado enzimático *B. subtilis*.

| Inhibidor | Concentración del inhibidor en la suspensión incubada | Actividad proteolítica residual, % respecto al control, incubado sin ningún inhibidor |
|---|---|---|
| Fenilmetilsulfo nil fluoruro (FMSF) | $2,5 \cdot 10^{-6}$ | 57,0 |
| | $5,0 \cdot 10^{-6}$ | 35,0 |
| | $7,5 \cdot 10^{-6}$ | 26,4 |
| | $10,0 \cdot 10^{-6}$ | 25,0 |
| Acido etilendiaminate traacético (EDTA) | $5,0 \cdot 10^{-3}$ | 62,0 |
| | $2,5 \cdot 10^{-3}$ | 77,3 |
| | $10,0 \cdot 10^{-3}$ | 81,0 |

Nota: tiempo de reacción 5 horas.

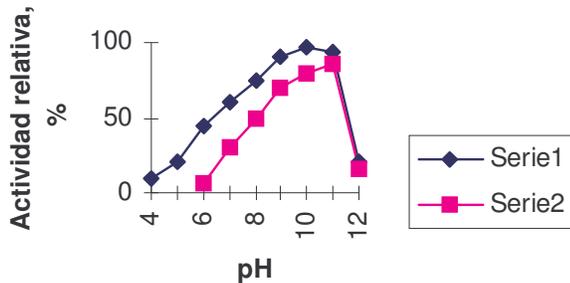
Se determinó la dependencia de la actividad proteolítica alcalina del preparado respecto a la temperatura y el valor de pH de incubación (ver figuras 1 y 2). Se estableció que a temperaturas entre los 40-55 C y valores de pH entre 9,0 y 11,0 la actividad catalítica obtuvo sus máximos valores, por lo cual estos fueron tomados como óptimos. El estudio del comportamiento del preparado durante un día de incubación (fig. 3 y 4) permitió encontrar que este preparado se caracteriza por su alto nivel de estabilidad en un amplio intervalo de estos parámetros, observándose sus valores máximos en pH de 6,0 a 9,0 y temperaturas de 20 a 40°C.

La presencia de iones de metal en la suspensión de los preparados afectan sustancialmente la actividad catalítica de las enzimas proteolíticas. En el caso del preparado estudiado de *B.subtilis* se encontró que los iones de metales ejercieron cierto efecto cuando estos se encontraban en concentraciones de $5 \cdot 10^{-3}$ M a $1 \cdot 10^{-2}$ M, 40°C, pH 9,2 durante dos horas. Así, al añadir acetato de calcio, cloruro de calcio o sulfuro de calcio se registró un incremento de la actividad proteolítica en un 9-11 %. También se aumento levemente la actividad (6,4: 7,8 y 4,2 %) al utilizar los cloruros de manganeso, potasio y el sulfuro de potasio respectivamente. El efecto de inhibición se presentó al añadir iones de bario, zinc, cobre y particularmente de plomo y aluminio.

El criterio fundamental de efectividad de las enzimas proteolíticas radica en su capacidad de hidrolizar diferentes sustratos proteicos. Luego de determinar cualitativa y cuantitativamente la composición de los hidrolizados de la caseína y de la hemoglobina en sistemas modelo (suspensiones con sustrato al 1 %, 40°C, pH 9,5), se encontraron 15 diferentes aminoácidos a los 30 minutos de iniciado el proceso, cuya

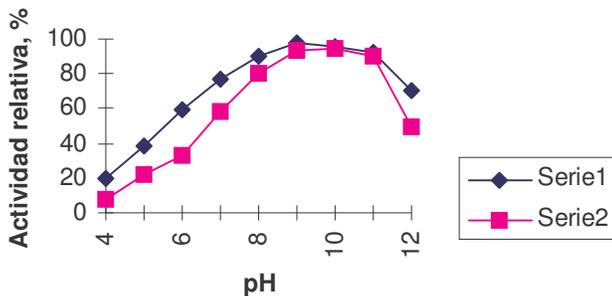
concentración al final de la hidrólisis (durante 5 horas) llegó incluso a duplicarse (tabla 3).

A - Proteasa *B. subtilis*



Sustrato: serie 1 - caseína 1 %, 2 - hemoglobina 1%

B- Alcalasa (Novo Nordisk)



Sustrato: serie 1 - caseína 1 %, 2 - hemoglobina 1%

Figura 1. Dependencia de la actividad proteolítica en función del pH

Serie :1. Proteasa *B.subtilis*. 2. Alcalasa Novo-Nordisk

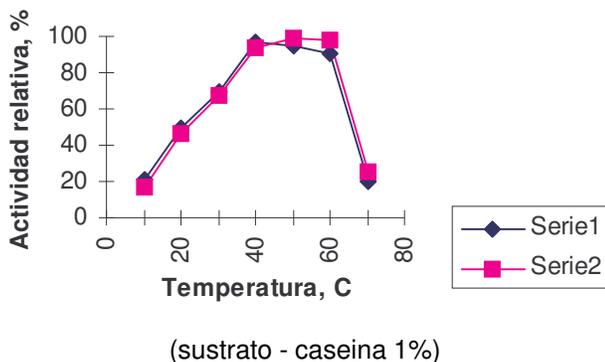
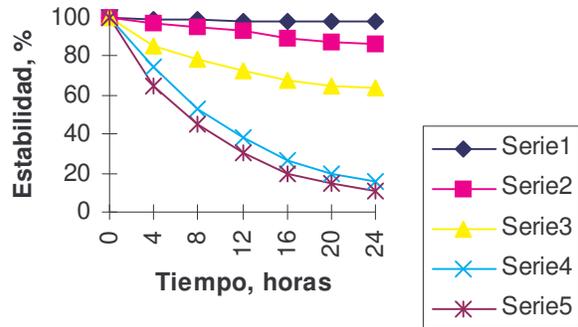
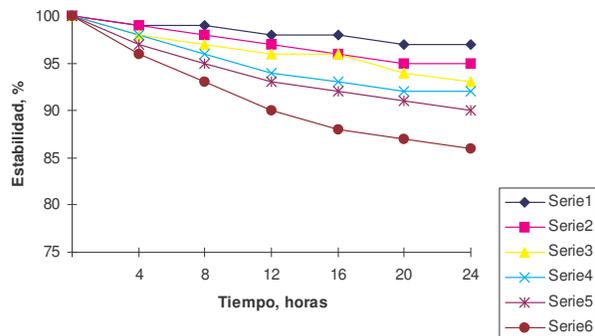


Figura 2. Dependencia de la actividad proteolítica en función de la temperatura



serie 1 - 20 C, 2 - 30 C, 3 - 40 C, 4 - 50 C, 5 - 60 C.

Figura3. Termoestabilidad del preparado *B.subtilis*.



pH: serie 1 - 8,0; 2 - 6,0; 3 - 7,0; 4 - 10,0; 5 - 5,0; 6 - 11,0

Figura 4. pH - Estabilidad del preparado *B.subtilis*.

Tabla 3. Análisis cualitativo y cuantitativo de los hidrolizados por acción del preparado enzimático *B.subtilis*.

| Aminoácidos presentes en los Hidrolizados de caseína | Concentración de los aminoácidos (mg/ml) durante: | |
|--|---|---------|
| | 30 minutos | 5 horas |
| Asparagina | 182,3 | 238,2 |
| Treolina | 79,8 | 97,8 |
| Serina | 95,6 | 130,3 |
| Glutamato | 377,8 | 602,7 |
| Prolina | 168,2 | 243,7 |
| Alanina | 65,9 | 82,3 |
| Valina | 107,6 | 154,4 |
| Isoleucina | 93,2 | 125,8 |
| Leucina | 221,7 | 235,7 |
| Tirosina | 99,7 | 105,2 |
| Fenilalanina | 89,2 | 152,2 |
| Histidina | 57,5 | 116,8 |
| Lisina | 202,8 | 242,9 |
| Arginina | 75,0 | 116,7 |
| Glicina | 36,0 | 55,2 |

Por cuanto el preparado enzimático *B.subtilis* estudiado es estable a condiciones de alcalinidad en valores de pH hasta 11 y a su vez termoestable, puede ser recomendado para su uso en procesos industriales en

los cuales se exige la hidrólisis de sustratos protéicos (carnes, pescado, industria de curtiembres, etc.), así como en calidad de biocomponente en preparación de detergentes, los cuales actúan principalmente en medios básico. En este último caso es importante subrayar que la estabilidad de esta enzima o incluso su activación en presencia de algunos de los iones existentes en los detergentes, permiten aún más fundamentar esta recomendación.

Tabla 4. Compatibilidad y estabilidad del preparado enzimático *B.subtilis* en combinación de los componentes de los detergentes

| Componente del detergente | Contenido del componente en el detergente, % | Compatibilidad, % | Estabilidad del preparado durante 12 meses, % |
|--|--|-------------------|---|
| Sustancias tensoactivas: | | | |
| Sulfanol | 2,0 | 100 | 90,8 |
| | 7,5 | 100 | 88,5 |
| | 15,0 | 100 | 87,3 |
| Sust. Tensoactivas noionicas: | | | |
| Alquilolamidos | 5,0 | 100 | 95,3 |
| Acidos orgánicos (C ₁₇ -C ₂₀) | 4,0 | 100 | 91,3 |
| Tripolifosfato de sodio | 40,0 | 100 | 87,3 |
| Carbonato de sodio | 12,0 | 100 | 90,7 |
| Bicarbonato de sodio | 10,0 | 100 | 92,8 |
| Metasilicato de sodio | 5,0 | 100 | 78,9 |
| Olorisantes | 0,1 | 100 | 98,4 |
| Perborato de sodio | 15,0 | 100 | 60,2 |
| Sulfato de sodio | hasta 100 | 100 | 98,4 |

Teniendo en cuenta lo anterior la siguiente etapa de la investigación se centró en el estudio del efecto de los componentes reales de los detergentes en la actividad proteolítica del preparado enzimático *B.subtilis*. Como es sabido los detergentes sintéticos son complejos de varios compuestos de la más variada composición química, entre los cuales se puede mencionar: sustancias tensoactivas (STA), fosfatos condensados, carbonatos, silicatos, sales sódicas del carboximetilcelulosa, sulfatos, perboratos, blanqueadores, olorisantes, etc. Por ello, además de poseer las antes mencionadas características de estabilidad, la proteasa debe ser compatible con el detergente y mantener su actividad dentro de él. En la tabla 4 se presentan los resultados de este estudio, según los cuales quedó demostrado que el preparado *B.subtilis* presenta un 100 % de compatibilidad con todos los componentes estudiados, encontrándose que la actividad del preparado se mantiene muy estable en la mayoría de los casos con niveles superiores al 90 % después de 12 meses de conservación. Solamente el

perborato de sodio afectó sensiblemente la estabilidad del preparado bajo las condiciones del experimento haciendo perder casi el 40 % de la actividad.

Es importante también tener en cuenta que al hacer parte de un detergente, el propuesto biocomponente deberá actuar cuando éste se encuentre solubilizado en agua. Por esta razón fue estudiada la actividad proteolítica del preparado enzimático en solución en combinación con cada uno de los componentes. Se pudo establecer que este preparado mantiene totalmente su actividad en soluciones con STA noiónicas y ácidos grasos sintéticos (con C₁₇ - C₂₀), así como no se reportó un efecto negativo con sulfato de sodio y sales sódicas del carboximetilcelulosa. En combinación con el sulfanol - STA aniónica y carbonatos la estabilidad del preparado se mantuvo en 82 y 88 % respectivamente. Sensiblemente se redujo la actividad de la enzima en presencia de las sales sódicas de tripolifosfato, metasilicato y particularmente de perborato, llegando a registrarse hasta el 55 % de la actividad proteolítica estándar del preparado. La diferencia del efecto de los diferentes componentes de los detergentes sobre la actividad proteolítica del preparado puede explicarse seguramente al comparar la estructura química de cada uno de ellos. Así, por ejemplo en el caso de las STA aniónicas, estas se ionizan en solución y los sulfogrupos radicalizados interactúan con los segmentos hidrofóbicos de la enzima. Este tipo de unión puede presentarse repetidamente y al igual que los enlaces de hidrógeno pueden mantener la estructura de la proteína en un estado muy estable. Las STA no iónicas no se ionizan y por eso la posibilidad de estabilizar la enzima no se manifiesta tan favorablemente como en el caso anterior. Es muy posible que en el caso del metasilicato de sodio disminuyan la estabilidad proteolítica del preparado *B.subtilis* debido a que esta sustancia genera condiciones de alcalinidad con valores de pH superiores a 12. En el caso de la disminución de la actividad proteolítica en presencia del perborato de sodio juega un importante papel la temperatura, ya que a 40-50 C esta sal empieza a descomponerse con desprendimiento de oxígeno, el cual puede entrar en reacción con el hidrógeno y otros grupos activos de la enzima, debilitando así su estructura.

Los anteriores resultados permitieron plantear algunas exigencias para la formulación de un detergente con participación de un biocomponente a partir del preparado *B.subtilis*. Se debe entonces utilizar STA aniónicas, limitando la participación de las STA no iónicas, de metasilicatos, así como de los tripolifosfatos, excluyendo además el uso de perborato de sodio o limitando su acción desnaturadora por intermedio de procedimientos tecnológicos que eviten su descomposición.

CONCLUSIÓN

De esta forma, en la presente investigación se estableció que el complejo enzimático segregado por el *B.subtilis* y obtenido en forma de preparado concentrado, presenta actividad catalítica característica de las proteasas, más exactamente como una serín-proteasa. Este preparado

presentó una alta estabilidad en rango de pH alcalino, así como una destacada termoestabilidad. Su capacidad para hidrolizar sustratos proteicos fue significativa, posibilitando su utilización en procesos de proteolisis. Su estabilidad y compatibilidad con los componentes de los detergentes permiten recomendarlo en calidad de biocomponente en la formulación de los mismos.

BIBLIOGRAFIA

Castellanos O, Sinitsyn A, Ermolova O. 1995. Biochem. 60. 10. p. 1609-1617.
Christensen P, Donelyan V (Novo). 1990. Detergent enzymes. Chim. Oggi. 8. 4. p.41-43.
Dikson M, Uebb K.. 1982. Fermentos. Edit Mir. Moscú. T. 3. 389p.
Fersht A. 1984. Enzyme structure and mechanism. 2nd de. New York: W.H.Freeman and Co.
Krysteva M, Peev G, Yotova K.. 1987. Study on the enzyme hydrolysis of waste photoemulsions. Acta-Biotechnol . 7. 1. p. 93-96
Lipova L, Fedorova L, Grebeshova R. 1973. Método para determinar la actividad proteolítica de los preparados enzimáticos que toman parte en los detergentes (trad). Prikl biojimia y Microbiol. 9. 4. p. 628-633.
Misset O. 1993. Stability of industrial enzymes. Stud.Org.Chem. 47. p.111-31
Nicolas J. 1995. Enzymes used in limit conditions. Examples in food

technology. C.R.Acad. Agric.Fr. 81, 2, p. 11-17.
Ota Y, Yamada K. 1966. Lipase from candida parapolitica. Agric and Biol Chem. 30. 4. p. 350-358.
Patente Us-396521. 1990. New Bacillus cells with deletions in at least 1 specific protease gene.
Patente Jp07265075. 1995. Stable modified protease composition for pharmaceuticals, foods and detergents, etc.
Patente Jp07236482. 1995. Alkaline protease produced by Bacillus sp.
Patente Jp07155182. 1995. Production of modified protease used for manufacturing toiletries and drugs.
Rujladieva A, Goriacheva M. 1976. Método para la determinación de la actividad amilolítica (trad). Fermentativnaia i cpirovaia promishlennost. Moscú. 9. 1. p. 9-12.
Soloviev B. 1966. Determinación de la actividad de la elastasa. En: Maduración de la carne.Edit. Nauka. Moscú. p. 299-300.

PROCESOS BIOTECNOLOGICOS Y MEDIOAMBIENTALES

DIVISION BIOTECNOLOGICA

- CONSULTORIA PARA EL DISEÑO DE PROCESOS DE FERMENTACION Y CULTIVO CELULAR
- ESTUDIO EN PLANTA PILOTO DE PROCESOS DE FERMENTACION Y CULTIVO CELULAR
- DISEÑO Y CONSTRUCCION DE FERMENTADORES Y COLUMNAS PARA CELULAS INMOVILIZADAS
- CONSULTORIA EN PRODUCCION DE VACUNAS, BIOINSECTICIDAS Y BIOFERTILIZANTES

DIVISION MEDIOAMBIENTAL

- CONSULTORIA AMBIENTAL
- AUDITORIAS AMBIENTALES
- SISTEMAS DE GESTIÓN AMBIENTAL
- EVALUACION DEL IMPACTO AMBIENTAL
- ASESORIA EN DISEÑO DE PRODUCTOS AMBIENTALES RESPONSABLES
- ASESORIA Y TRAMITE DE LICENCIAS AMBIENTALES
- EDUCACION AMBIENTAL

PUBLICIDAD PROCESOS BIOTECNOLOGICO

Carrera 99 No. 130B - 15 - Teléfono: 684 49 88 - Santafé de Bogotá, D.C.