

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DEL GEN β -GALACTOSIDASA DE *Bacillus* SP. MSP7 AISLADO DE LAS SALINAS DE PILLUANA, SAN MARTÍN - PERÚ

Partial characterization of the β -galactosidase gen from *Bacillus* sp. MSP7 isolated from Pilluana Saltern, San Martin - Peru

Amparo I. Zavaleta, Joseph Ávila, Elizabeth L. Chávez-Hidalgo, Victor Izaguirre

Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos

RESUMEN

Las β -galactosidasas (EC.3.2.1.23) son glicosil hidrolasas que catalizan principalmente la hidrólisis de β -D-galactósidos, son producidas por diversos tipos de microorganismos y de interés en la síntesis de oligosacáridos. Una de las fuentes potenciales para la obtención de enzimas que cumplan estas características son los microorganismos aislados de ambientes extremos como las salinas. En este estudio, se clonó y caracterizó parcialmente el gen β -galactosidasa de *Bacillus* sp. MSP7, aislado de las salinas de Pilluana (San Martín), Perú, el cual presentó actividad enzimática de 65 U/mg de células secas, mayor que otras cuatro cepas de *Bacillus* sp. aisladas del mismo lugar. Con este fin, el gen en cuestión se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos, obteniéndose un amplicón de aproximadamente 2000 pb; el producto se purificó y unió al vector pUC19, utilizando *Escherichia coli* JM109; los clones recombinantes fueron secuenciados parcialmente. Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se analizaron mediante herramientas bioinformáticas, tales como Blast, Clustal y Mega. La secuencia nucleotídica de 957 pb correspondiente al gen β -galactosidasa de *Bacillus* sp MSP7, presentó 98% de similitud con el de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 (DSM 13) y a nivel aminoacídico, mostró 99% de similitud con las mismas cepas. La proteína pertenece a la familia GH 42.

Palabras clave: : gen β -galactosidasa, *Bacillus* sp., *Bacillus licheniformis*, análisis *in silico*, salinas de Pilluana.

SUMMARY

The β -galactosidases (EC3.2.1.23) are glycosyl hydrolases which mainly catalyze the hydrolysis of β -D-galactosides in various types of microorganisms, which are used in the synthesis of oligosaccharides. One of the potential sources for the production of enzymes that show these characteristics are microorganisms from extreme environments, such as salt brine. In this study, was cloned and characterized the betagalactosidase gene from *Bacillus* sp MSP7 isolated from Pilluana saltern in San Martin, Peru, because it shown enzymatic activity of 65 U/mg dried cells, the greatest activity than other four *Bacillus* sp. strains isolated from same village. For this, specific primers were designed from regions of consensus amino acid sequences of the Bacillus genus from available betagaltsosidase sequences in data banks. Betagalactosidase gene of *Bacillus* sp. MSP7 was amplified by polymerase chain reaction generating an amplicon of approximately 2000 bp, this product was purified and joined to the pUC19 vector, *Escherichia coli* JM109 was used, the recombinant clones were sequenced partially. The nucleotide and amino acid sequences were analyzed using bioinformatics tools such as Blast, Clustal, Mega. The 957 bp nucleotide sequence of the beta-galactosidase gene showed 98% of similarity with its corresponding from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 (DSM 13), and to amino acid level had 99% similarity with the same strains. The protein belong to glycosyl hidrolase family 42.

Keywords: β -galactosidase gen, *Bacillus* sp., *Bacillus licheniformis*, *in silico* analysis, Pilluana saltern.

INTRODUCCIÓN

Las β -galactosidasas (EC3.2.1.23) son glicosil hidrolasas que catalizan la hidrólisis de β -D-galactósidos, principalmente lactosa; están en diversos tipos de microorganismos tales como bacterias, levaduras, mohos y arqueas. El clonaje y expresión de los genes de estas enzimas, han permitido la obtención β -galactosidasas y su uso en bioprocesos industriales, como la hidrólisis de la lactosa, para aumentar la digestibilidad de la leche y la mejora de las propiedades de los productos lácteos.

En la última década, las aplicaciones potenciales de β -galactosidasas son la transgalactosidación para la producción galactooligosacáridos (GOS) y la glicosilación de diversas proteínas de interés clínico mediante procesos limpios y sostenibles⁽¹⁻⁴⁾.

En un inicio, las β -galactosidasas fueron clasificadas, en base a la similitud de sus secuencias aminoacídicas, en 4 categorías. Actualmente, las β -galactosidasas pertenecen a diversas familias, siendo las más significativas 1, 2, 35 y 42. La glicosil hidrolasa (GH) 1 incluye a la β -galactosidasa de *Sulfolobus*

solfataricus, enzima que posee 489 aminoácidos. A la familia GH 2, pertenece la β -galactosidasa lacZ de *E. coli*, contiene una subunidad de aproximadamente 1000 aminoácidos y muestra secuencias altamente similares con las β -glucuronidasas de animales. Las que pertenecen a la familia GH 35, catalizan la hidrólisis de los residuos terminales β -galactosil de carbohidratos, galactolípidos y glicoproteínas, presentes en eucariotas como *Arabidopsis thaliana* y angiospermas, y en microorganismos como *Xanthomonas manihotis*, *Arthobacter* sp. y *Aspergillus niger*, productores de β -galactosidasas con secuencias fuertemente similares a las β -galactosidasas animales. En las GH 42, se encuentra la β -galactosidasa de *Thermus thermophilus* A4, que presenta una estructura homotrimérica, con residuos catalíticos son Glu141 y Glu132. Muchas β -galactosidasas pertenecen a la familia GH2, sin embargo las de microorganismos termófilos, psicrófilos y halófilos, en su mayoría, pertenecen a la familia GH42⁽⁵⁻¹³⁾.

Generalmente, las preparaciones comerciales de β -galactosidasas son derivadas de levaduras mesófilas como *Kluyveromyces lactis*. Sin embargo, los estudios sobre β -galactosidasas bacterianas de arqueas extremófilas son crecientes debido a que resisten amplio rango de pH además de altas o bajas temperaturas y concentraciones salinas. Tal es el caso de β -galactosidasas recombinantes aisladas de *Arthobacter* sp., *Planococcus* sp. (psicrófilos), *Pseudoalteromonas haloplanktis* (alcalófila), *Pyrococcus woesei* (hipertermófilo) y *Haloferax alicantei* (halófilo). Estas enzimas y otras son utilizadas en glicotecnología para la síntesis de oligosacáridos enantioméricamente puros, con el fin de contribuir en la elucidación de sus funciones biológicas cuando forman glicoproteínas o glicolípidos⁽¹⁴⁻¹⁸⁾.

En ambientes salinos se han descrito diversas especies del género *Bacillus*, tales como: *B. qingdaonensis*, *B. aidingensis*, *B. salarius* y *B. halocharis*, las cuales producen diversas enzimas hidrolíticas. La primera y la tercera de las especies antes mencionadas hidrolizan la lactosa. Asimismo, pueden existir otros miembros de este género que tengan capacidad para hidrolizar la lactosa, por lo que serían de gran interés como moldes o firmas para el diseño de β -galactosidasas con características especiales para soportar condiciones exigentes de reacción, como altas temperaturas y concentraciones de sustratos.

En Perú, el estudio de genes de bacterias aisladas de ambientes salinos es escaso. El interés por la caracterización del gen β -galactosidasa de *Bacillus* sp. MSP7, aislado de las salinas de Pilluana (San Martín),

fue debido a su alta actividad hidrolítica sobre el orto-nitro-fenil-galactopiranosido con respecto a otras cepas procedentes del mismo lugar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de *Bacillus* sp. MSP7

Cinco cepas de *Bacillus* sp. denominadas MSP1, MSP5, MSP7, MSP12 y MSP17, fueron aisladas de las Salinas de Pilluana (San Martín), y presentaron actividad β -galactosidasa en estudios preliminares. Estas bacterias se cultivaron en matraces con 10 mL de caldo Luria Bertani, conteniendo lactosa 1%, a 37 °C por 18 h con agitación a 120 rpm. Las células se cosecharon por centrifugación a 4000 rpm por 5 min. El precipitado celular se lavó dos veces con buffer fosfato 50 mM, pH 7,0. Las células se resuspendieron en 1000 μ L de buffer Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mM, KCl 10 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM y β -mercaptoetanol 50 mM), pH 7,0. A 250 μ L de la suspensión celular se añadieron 25 μ L de cloroformo y 25 μ L de SDS 1%, se homogeneizó y se añadieron 100 μ L de o-NPG 4 mg/mL, se incubó a 37 °C durante 10 min, la reacción se inactivó añadiendo 250 μ L de Na_2CO_3 1 M. Se centrifugó y, en el sobrenadante, se determinó el o-nitrofenol liberado por espectrofotometría a 420 nm. Una unidad de enzima fue definida como 1 μ mol de o-nitrofenol formado por min.

Diseño de cebadores

Se diseñaron cebadores a partir de secuencias aminoacídicas de β -galactosidasas de bacterias del género *Bacillus*, utilizando programas bioinformáticos de libre acceso como Block Maker y Blast. Los cebadores seleccionados fueron:

F1, 5'-ATGCCAAAAATTTATACGAC-3';
 F2, 5'-ATGCCAAAAATTTATACGCCCAAGC-3';
 R, 5'-TCTTTTGTCTTTTACCGCTATTCTGGCCTC-3'

Extracción de ADN genómico

Se prepararon cultivos frescos de *Bacillus* sp. MSP7 y MSP12 en medio agua de sales 5% conteniendo extracto de levadura 0,5% y se incubó a 37 °C durante 12 h⁽¹⁸⁾. Las células se cosecharon por centrifugación, el precipitado celular se resuspendió con buffer Tris cloruro de sodio EDTA, se añadieron SDS y proteinasa K, y se incubó a 50 °C durante 8 h. Los ácidos nucleicos se purificaron con igual volumen de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1 v/v. El ADN se precipitó con acetato de sodio 3 M y etanol absoluto, y se resuspendió en buffer tris/EDTA. La concentración,

integridad y pureza del ADN se determinó por electroforesis en gel de agarosa 1% utilizando estándares de ADN de concentración conocida ⁽¹⁹⁾.

Amplificación de genes β -galactosidasa

Aproximadamente 50 μ g de ADN genómico se amplificaron mediante PCR en un volumen final de 25 μ L. La mezcla de reacción contenía: KCl 50 mM, Tris/HCl (pH 9,0 a 25 °C) 10 mM, triton X-100 0,1% (v/v), MgCl₂ 1,5 mM, desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 200 μ M, cebadores 25 ρ moles y *Taq* ADN polimerasa 1,5 U. Las condiciones de cada ciclo de reacción, programadas en un termociclador (Perkin Elmer 2400), fueron desnaturalización a 94 °C por 45 s, hibridación a 55 °C por 1 min y polimerización a 72 °C por 2 min. Estas condiciones se repitieron durante 35 ciclos y al final se incubó a 72 °C por 7 min. En todos los casos se consideraron controles negativos de la reacción de PCR sin añadir ADN molde. Los productos de PCR obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa 1%, en buffer TBE 0,5X (Tris 89 mM, Borato 89 mM, EDTA 2 mM a pH 8,2), separados a voltaje constante de 80 V. Posteriormente, los ácidos nucleicos se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron bajo luz UV. La cuantificación del ADN se realizó por espectrofotometría a 260 nm. Los productos amplificados se cortaron con *Hae* III (Fermentas) según indicaciones del fabricante.

Clonaje de genes β -galactosidasa

El ADN amplificado del gen β -galactosidasa de *Bacillus* sp. MSP7, se unió al vector pUC-19 en una proporción inserto:vector de 3:1. Se utilizó

Escherichia coli JM109 como hospedera. Las células transformadas se cultivaron en placas conteniendo agar LB, ampicilina, IPTG, X-GAL (Sigma), la actividad hidrolítica se determinó por la formación de colonias pigmentadas ⁽¹⁹⁾.

Secuenciación de clones recombinantes

Los plásmidos recombinantes fueron extraídos de las colonias pigmentadas, que contenían insertos de aproximadamente 2000 pb, se purificaron por columnas de intercambio iónico y se secuenciaron.

Análisis bioinformático

Las secuencias nucleotídicas se tradujeron a aminoácidos y se analizaron mediante los programas Blast, ClustalX y Mega 5.1, todos de libre acceso ⁽²⁰⁾.

Las secuencias aminoacídicas utilizadas pertenecen a *Bacillus cellulosilyticus* DSM2522 (315472854), *Bacillus circulans* 1 (142575), *Bacillus circulans* 2 (551691), *Bacillus coagulans* (294874572), *Bacillus halodurans* c125 (10174641), *Bacillus licheniformis* ATCC14580 (52350456), *Bacillus megaterium* WSH002 (345445220), *Bacillus subtilis* (175950827), *Clostridium perfringens* (710644), *Lactobacillus acidophilus* (183013532), *Thermotoga maritima* MSB8 (4980811) y *Bacillus stearothermophilus* (114936). Como grupo externo se utilizó a *Escherichia coli* BL21 (242376130). Todas las secuencias se alinearon y cortaron con el programa ClustalX y editaron manualmente con Bioedit. El árbol filogenético se realizó con el programa MEGA 5.1

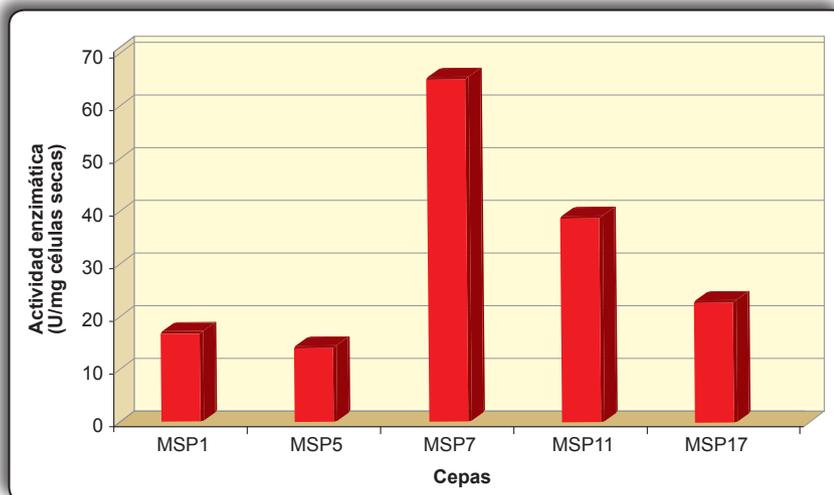


Figura 1. Actividad β -galactosidasa de cepas bacterianas aisladas de las salinas de Pilluana.

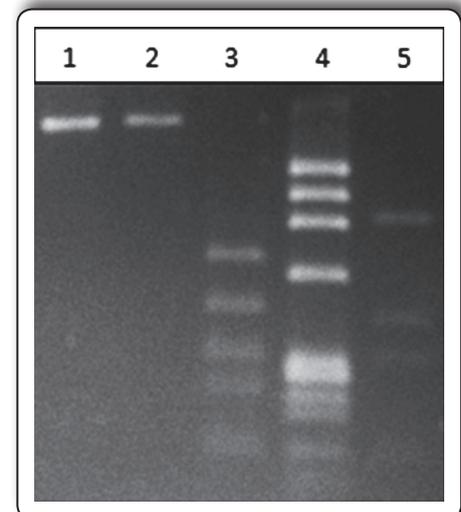


Figura 2. Gel de agarosa mostrando los perfiles de restricción del gen β -galactosidasa amplificado y cortado con *Hae* III. Línea (muestra): 1, MSP7; 2, MSP12; 3, MSP7 + *Hae* III; 5, MSP12 + *Hae* III; 4, Marcador de peso molecular (Φ X-*Hae* III).

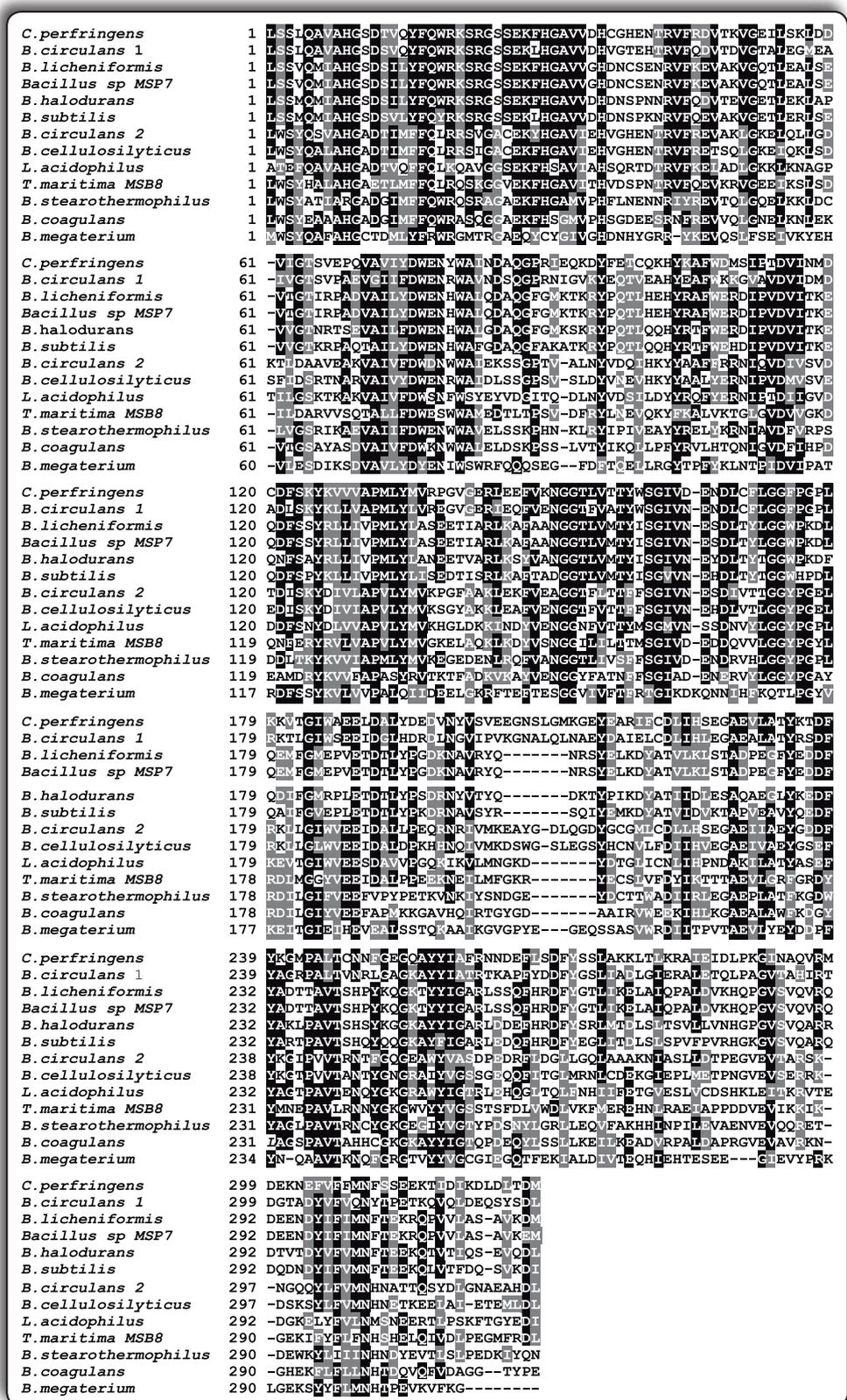


Figura 3. Alineamiento de la secuencia aminoacídica parcial de la β-galactosidasa de *Bacillus* sp. MSP7 aislado de las Salinas de Pilluana.

utilizando el método de Maximum Likelihood con bootstrap de 1000 replicaciones.

RESULTADOS

A cinco cepas de *Bacillus* sp. denominadas MSP1, MSP5, MSP7, MSP12 y MSP17; aisladas de las salinas de Pilluana, que presentaron actividad β-galactosidasa en estudios preliminares, se les cultivó en caldo LB contenido lactosa 1%. Las cepas de *Bacillus* sp. MSP7 y MSP12 presentaron actividad enzimática de 65 y 42 U/mg de células secas, respectivamente (Figura 1). Ambas cepas presentaron características morfológicas similares en cultivo líquido y en placa, por lo que se infiere que podrían ser dos cepas de la misma especie.

Para el diseño de cebadores específicos de β-galactosidasas se hicieron alineamientos múltiples con secuencias de especies del género *Bacillus*. Los cebadores seleccionados originaron un producto de PCR de aproximadamente 2000 pb en las cepas *Bacillus* sp. MSP7 y MSP12; para discriminar si ambas cepas pertenecían a la misma especie, los productos amplificados se cortaron con *Hae* III obteniéndose perfiles de restricción diferentes lo cual indicó que correspondían a dos especies distintas (Figura 2), por lo que el estudio se centró en el gen β-galactosidasa de *Bacillus* sp. MSP7, que presentó

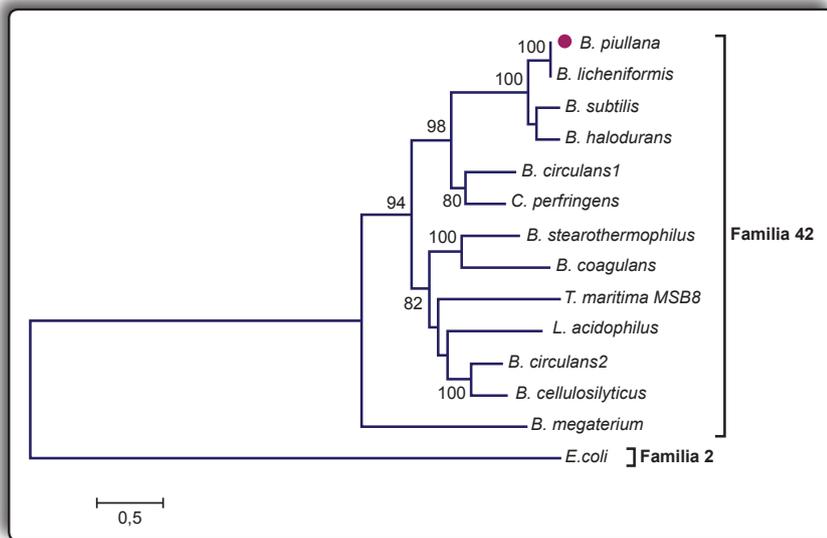


Figura 4. Árbol filogenético de la secuencia aminoacídica parcial de β -galactosidasas de la familia 42, realizado con Bootstrap de 1000 replicaciones. El círculo indica la cepa *Bacillus* sp. MSP7 aislada de las Salinas de Pilluana.

la mayor actividad enzimática en comparación con las otras cinco cepas productoras de β -galactosidasa. El producto génico amplificado se clonó y secuenció parcialmente.

La secuencia nucleotídica (957 pb) se tradujo a aminoácidos usando el programa Blast. Para el análisis aminoacídico se utilizaron secuencias de β -galactosidasas de *Bacillus licheniformis* (684 aa), *B. circulans* (675 aa), *B. stearothermophilus* (672 aa), mediante alineamiento múltiple empleando el programa ClustalW2.1. En la figura 3, se presenta el alineamiento de la secuencia aminoacídica parcial de la β -galactosidasa de *Bacillus* sp. MSP7, la cual presentó 99% de similitud con *B. licheniformis* ATCC14580, mientras que con las de *B. circulans* y *B. stearothermophilus* mostró 31 y 32% de similitud, respectivamente. Las β -galactosidasas de estas especies han sido clasificadas en la familia 42 de las glicosilhidrolasas^(9,10).

Las secuencias aminoacídicas alineadas en la figura 3 corresponden al extremo carboxilo de las β -galactosidasas procedentes de especies del género *Bacillus*, éstas presentan varias zonas conservadas, indicadas por los fondos negros (Figura 3). La alta similitud de secuencia aminoacídica de la cepa *Bacillus* sp. MSP7 con *B. licheniformis* se puede evidenciar en el árbol filogenético (Figura 4). Asimismo, presenta cercanía con *B. subtilis* y *B. halodurans*, pero es distante de *B. megaterium*. Las secuencias aminoacídicas seleccionadas para el alineamiento pertenecen a la familia de glicosil hidrolasas 42 a excepción de *E. coli*.

DISCUSIÓN

Las secuencias nucleotídicas o aminoacídicas de glicosilhidrolasas, como las β -galactosidasas, son registradas continuamente en bancos de datos como “genbank” para su uso en estudios filogenéticos y, sobre todo, para su aprovechamiento en el diseño de nuevas β -galactosidasas por mutagénesis sitio dirigida, las cuales deben cumplir las exigencias de las industrias que utilizan y comercializan enzimas.

En el análisis parcial de las secuencias nucleotídica (957 pb) y aminoacídica (319 aa), ambas presentaron alto grado de similitud con las de *Bacillus licheniformis*, especie reconocida segura por la FDA.

Al correlacionar este análisis con las características fisiológicas de *Bacillus* sp. MS7, bacteria aislada de las salinas tropicales de Pilluana, parece ser que se trata de una nueva cepa de *B. licheniformis* adaptada a altas concentraciones salinas, lo cual es de gran interés tanto para la industria alimentaria como la quesera.

La secuencia nucleotídica del gen β -galactosidasa de *Bacillus* sp. sirve como molde para mejorar propiedades de actividad y estabilidad de esta enzima por ingeniería de proteínas, de gran utilidad en la síntesis de nuevos productos como galactooligosacáridos, proteínas, lípidos glicosidados y galactosidación de productos aromáticos⁽²⁻⁴⁾.

CONCLUSIONES

El gen β -galactosidasa de *Bacillus* sp. MSP7 presenta 99% de similitud de secuencia aminoacídica con la de *B. licheniformis*, bacteria reconocida como segura por la FDA. La proteína pertenece a la familia GH42.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aider M, De Halleux D. Isomerization of lactose and lactulose production: review. Trends in Food Science & Technology 2007; 18(7): 356-64.
2. Alliet P, Scholtens P, Raes M, Hensen K, Jongen H, Rummens JL, et al. Effect of prebiotic galactooligosaccharide, long-chain fructo-oligosaccharide infant formula on serum cholesterol and triacylglycerol levels. Nutrition 2007; 23(10): 719-23.
3. Bridiau N, Taboubi S, Marzouki M, Legoy MD, Maugard

- T. Galactosidase catalyzed selective galactosylation of aromatic compounds. *Biotechnology Progress* 2006; 22(1): 326-30.
4. Husain Q. Beta galactosidases and their potential applications: a review. *Crit Rev Biotechnol* 2010; 30(1): 41-62.
 5. Park HY, Kim HJ, Lee JK, Kim D, Oh DK. Galactooligosaccharide production by a thermostable β -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2008; 24: 1553-8.
 6. Berger JL, Lee BH, Lacroix C. Purification, properties and characterization of a high-molecular-mass β -galactosidase isoenzyme from *Thermus aquaticus* YT-1. *Biotechnol Appl Biochem* 1997; 25(1): 29-41.
 7. Coker JA, Sheridan PP, Loveland-Curtze J, Gutshall KR, Auman AJ, Brenchley JE. Biochemical characterization of a β -galactosidase with a low temperature optimum obtained from an Antarctic *Arthrobacter* isolate. *Journal of Bacteriology* 2003; 185(18): 5473-82.
 8. Daniel RA, Haiech J, Denizot F, Errington J. Isolation and characterization of the *lacA* gene encoding β -galactosidase in *Bacillus subtilis* and a regulator gene, *lacR*. *J. Bacteriol.* 1997; 179(17): 5636-8.
 9. Fujimoto H, Miyasato M, Ito Y, Sasaki T, Ajisaka K. Purification and properties of recombinant β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Glycoconjugate Journal* 1998; 15(2): 155-60.
 10. Hidaka M, Fushinobu S, Ohtsu N, Motoshima H, Matsuzawa H, Shoun H, *et al.* Trimeric crystal structure of the glycoside hydrolase family 42 β -galactosidase from *Thermus thermophilus* A4 and the structure of its complex with galactose. *Journal of Molecular Biology* 2002; 322(1): 79-91.
 11. Li Y, Wang H, Lu L, Li Z, Xu X, Xiao M. Purification and characterization of a novel β -galactosidase with transglycosylation activity from *Bacillus megaterium* 2-37-4-1. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2009; 158(1): 192-9.
 12. Nakagawa T, Fujimoto Y, Ikehata R, Miyaji T, Tomizuka N. Purification and molecular characterization of cold-active β -galactosidase from *Arthrobacter psychrolactophilus* strain F2. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006; 72(4): 720-5.
 13. Gul-Guven R, Guven K, Poli A, Nicolaus B. Purification and some properties of a β -galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii* isolated from antarctica. *Enzyme and Microbial Technology* 2007; 40(6): 1570-7.
 14. Dąbrowski S, Maciuńska J, Synowiecki J. Cloning and nucleotide sequence of the thermostable β -galactosidase gene from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and some properties of the isolated enzyme. *Molecular Biotechnology* 1998; 10(3): 217-22.
 15. Li L, Zhang M, Jiang Z, Tang L, Cong Q. Characterization of a thermostable family 42 β -galactosidase from *Thermotoga maritima*. *Food Chemistry* 2009; 112(4): 844-50.
 16. Holmes ML, Scopes RK, Moritz RL, Simpson RJ, Englert C, Pfeifer F, *et al.* Purification and analysis of an extremely halophilic beta-galactosidase from *Haloferax alicantei*. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1337(2): 276-86.
 17. Sheridan PP, Brenchley JE. Characterization of a salt-tolerant family 42 beta-galactosidase from a psychrophilic antarctic *Planococcus* isolate. *Appl. Environ. Microbiol* 2000; 66(6): 2438-44.
 18. Flores-Fernandez ML. Diversidad genética de bacterias halotolerantes productoras de lipasas extracelulares aisladas de las Salinas de Pilluana-San Martín. [Tesis para optar el Título de Químico-Farmacéutico]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2010.
 19. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 2001.
 20. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(17): 3389-402.

Correspondencia

Nombre: Amparo I. Zavaleta

Dirección: Laboratorio de Biología Molecular.

Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM Jr. Puno 1002, Lima 1.

E-mail: azavaletap@unmsm.edu.pe