

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 494 282

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 24319

(54) Procédé de préparation d'hydrolysats de kératine et composition oligopeptidique obtenue par ce procédé.

(51) Classification internationale (Int. Cl. 3). C 07 G 7/00; A 61 K 7/06.

(22) Date de dépôt..... 14 novembre 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 20 du 21-5-1982.

(71) Déposant : Société anonyme dite : L'OREAL, résidant en France.

(72) Invention de : Pierre Bore et Jean-Claude Arnaud.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Jacques Peusset, conseil en brevets,
3, square de Maubeuge, 75009 Paris.

PROCEDE DE PREPARATION D'HYDROLYSATS DE KERATINE ET COMPOSITION OLIGOPEPTIDIQUE OBTENUE PAR CE PROCEDE.

La présente invention a trait à un procédé de préparation de composition oligopeptidique à partir d'un matériau kératinique que l'on soumet à une hydrolyse enzymatique.

On sait que les hydrolysats de kératine et, en particulier, les hydrolysats contenant une proportion majeure d'oligopeptides ont un grand intérêt dans l'industrie cosmétique pour leur action sur l'état de surface du cheveu ou sur la peau et dans l'industrie alimentaire. Cependant, l'intérêt de ces compositions est essentiellement fonction de leur contenu en oligopeptides, c'est-à-dire que le matériau protéique constitué par la kératine servant de matière première doit être fractionné en chafnes oligopeptidiques contenant plusieurs acides aminés mais ayant un poids moléculaire suffisamment faible pour être hydrosoluble. L'intérêt des hydrolysats de kératine est donc d'autant plus grand que ces hydrolysats contiennent peu d'acides aminés libres. Par ailleurs, on a constaté qu'il était très intéressant de conserver dans les compositions oligopeptidiques les liaisons cystine existant dans la kératine, la cystine étant plus énergétique sous forme d'oligopeptides que sous forme d'acide aminé.

Dans l'état de la technique, on a proposé de préparer des hydrolysats de kératine soit à partir de matières premières kératiniques non dégradées, par exemple les soies de porc, les plumes de volaille ou la corne, soit à partir de produits résiduaires fibreux et de déchets kératiniques, par exemple les sous-produits de charcuterie et de tannerie. On soumet ces kératines ou dérivés kératiniques soit à des hydrolyses chimiques alcalines ou acides, partielles afin de limiter la production d'acides aminés libres, soit à des hydrolyses enzymatiques.

On sait que les enzymes protéolytiques usuels (pepsine, trypsine, chymotrypsine, papain) n'ont aucune activité notable sur les kératines naturelles non dégradées, c'est-à-dire les kératines n'ayant subi aucun traitement chimique, industriel ou cosmétique. Même les enzymes décrits comme d'éventuels kératinolytiques, comme par exemple les enzymes extraits des différentes souches de "Kératomices" (pronase, kératinase, M'zyme, PSF 2019) ont, en fait, des

activités très réduites sinon nulles sur les principaux matériaux kératiniques naturels ; par exemple les rendements de digestion des cheveux humains soumis à de tels enzymes sont inférieurs à 10 %. Il est certain que les déchets et 5 sous-produits kératiniques industriels peuvent être digérés par des enzymes protéolytiques ou kératolytiques mais, dans ce cas, cela provient du fait que le matériau kératinique de départ est dégradé et que la plupart des liaisons cystiniques de la kératine ont disparu : il en résulte que les hydrolysats 10 obtenus ne contiennent pratiquement pas de cystine. En fait, toutes les hydrolyses enzymatiques, qui ont une efficacité non négligeable, sont des hydrolyses qui ou bien s'appliquent sur une matière première, dans laquelle les liaisons cystine ont déjà disparu en grande partie, ou bien s'appliquent sur un matériau auquel on fait subir un prétraitement ayant pour but 15 de faire disparaître la majorité des liaisons cystine. Dans tous les autres cas, l'action enzymatique sur la kératine a un rendement pratiquement nul.

Dans l'état de la technique, on a également proposé, 20 pour obtenir des hydrolysats de kératine, de réaliser des hydrolyses chimiques acides ou alcalines. Les hydrolyses acides sont difficilement maîtrisables et les hydrolysats obtenus sont riches en acides aminés libres même lorsque les solutions acides sont peu concentrées : le rendement en oligopeptides 25 est donc faible. Les hydrolyses alcalines sont pratiquées en présence d'hydroxydes alcalins ou d'hydroxydes d'ammonium quaternaire et entraînent la destruction de certains acides aminés et, en particulier, de la cystine : il y a formation de H₂S, de lanthionine, de lysinoalanine et de cystéine. 30 Les hydrolysats ainsi obtenus sont donc encore très pauvres en cystine.

On constate donc que, dans l'état de la technique, aucune méthode de préparation d'hydrolysats de kératine ne permet d'obtenir des oligopeptides contenant une concentration importante en cystine. Ou bien les hydrolysats ont un faible rendement en oligopeptides et comportent un grand nombre d'acides aminés libres, ou bien les hydrolysats ne contiennent pratiquement plus de cystine.

La présente invention a pour but de proposer un 40 procédé de préparation de composition oligopeptidique à for-

te concentration en cystine, ce procédé comportant une hydrolyse enzymatique de la kératine après que celle-ci ait subi un prétraitement ne détruisant pas la cystine. Dans l'état de la technique, tous les prétraitements appliqués aux matériaux kératiniques pour permettre les actions enzymatiques étaient des prétraitements destructeurs de cystine. A cet égard, on peut citer les procédés par oxydation qui transforment de façon irréversible la cystine en acide cystéique, les procédés de traitement au sulfite, qui réduisent partiellement la cystine en cystéine avec formation en quantité équivalente de S-sulfocystéine, les procédés par réduction aux thiols, qui transforment la cystine en cystéine mais également en Lanthionine (avec perte de soufre) et en disulfure mixte. Dans tous les cas, les hydrolysats enzymatiques obtenus sont, bien entendu, pauvres en cystine puisque l'action des enzymes avec un bon rendement était considérée dans l'état de la technique comme essentiellement incompatible avec la présence de liaisons cystine dans le matériau à hydrolyser.

Selon l'invention, on a découvert, de façon surprise, que l'on pouvait obtenir une action d'hydrolyse enzymatique avec un bon rendement sans détruire notamment les liaisons cystine initialement présentes dans le matériau kératinique soumis à l'hydrolyse, à condition de soumettre préalablement le matériau à hydrolyser à une action de sensibilisation réalisée soit avec des capteurs de liaison hydrogène constitués par des solutions concentrées en électrolytes, soit avec des solvants polaires qui dissolvent les ciments interfibrillaires existant entre les paquets de fibrilles constitués de micro-fibrilles elles-mêmes formées des chaînes protéïniques de la kératine, soit encore, dans le cas où le matériau kératinique comporte une cuticule enveloppant le produit kératinique proprement dit, avec un agent décorticulant.

Dans tous les cas, le traitement de sensibilisation proposé selon l'invention n'a aucune action sensible au niveau des liaisons cystine de la kératine, de sorte que les hydrolysats obtenus comportent toujours plus de 30 % des liaisons cystine existant dans le matériau kératinique de départ. Au contraire, dans les compositions analogues de l'état de la technique, riches en oligopeptides, on ne retrouvait jamais plus de 10% des liaisons cystine du matériau kératini-

que de départ.

La présente invention a donc pour objet un nouveau procédé de préparation d'une composition oligopeptidique par hydrolyse d'un matériau kératinique, ce procédé comportant un 5 traitement par des enzymes protéolytiques et/ou kératolytiques, caractérisé par le fait qu'avant le traitement enzymatique on soumet le matériau kératinique à un traitement de sensibilisation réalisé au moyen d'au moins un agent de sensibilisation pris dans le groupe formé par les électrolytes agissant 10 en milieu aqueux à une concentration supérieure ou égale à 8 moles par litre et les solvants polaires, ou, dans le cas où le matériau kératinique est constitué de kératine à cuticule, d'au moins un agent décutilant pris dans le groupe formé par les ultrasons et l'acide formique à une concentration supérieure 15 à 90% en poids dans le milieu de traitement.

Parmi les électrolytes particulièrement utilisables dans le procédé selon l'invention, il convient de citer le bromure de lithium.

Lorsque l'agent de sensibilisation est constitué 20 d'un ou de plusieurs solvants polaires, on préfère que ces solvants polaires constituent au moins 75% en poids du milieu où s'effectue le traitement de sensibilisation. Parmi les solvants particulièrement utilisables, il convient de citer le diméthyl-formamide et le méthanol.

25 Lorsque le traitement de sensibilisation est réalisé au moyen d'au moins un électrolyte et/ou d'au moins un solvant polaire, ledit traitement s'effectue, de préférence, pendant un temps supérieur à 30 minutes et à une température comprise entre la température ambiante et la température de reflux 30 du milieu à pression atmosphérique.

Lorsqu'on utilise comme agent décutilant, l'acide formique dans le traitement de la kératine à cuticule, la sensibilisation s'effectue, de préférence, pendant un temps supérieur à 30 minutes et à une température comprise entre la température ambiante et la température de reflux à la pression atmosphérique.

35 Lorsque l'agent décutilant est une émission d'ultrasons, on a constaté que l'on obtenait des résultats satisfaisants lorsque les ultra-sons ont une fréquence comprise entre 40 20 KHz et 70 KHz et un temps d'action supérieur à 30 mn, la

puissance dissipée étant comprise entre 50 et 150 watts par dm³ traité.

Lorsque le matériau kératinique servant de matière première a subi le traitement de sensibilisation sus-mentionné, on peut réaliser une hydrolyse enzymatique mettant en oeuvre des enzymes protéolytiques et/ou kératolytiques et obtenir des rendements d'hydrolyse très satisfaisants. Le traitement enzymatique est avantageusement réalisé à un pH inférieur ou égal à 9 et à une température inférieure à 50°C pour éviter une hydrolyse alcaline perturbante, de sorte que les enzymes ne sont pas forcément au pH correspondant à leur optimum de cinétique. La concentration d'enzymes utilisée est fonction des conditions opératoires et suffisante pour obtenir une action enzymatique dans le milieu. Le traitement enzymatique a généralement une durée comprise entre 20 h et 90 h.

L'hydrolysat obtenu peut être, soit utilisé sous forme de solution après ajustement du pH, soit lyophylisé, soit dialysé, soit atomisé sans élévation de température, soit récupéré sous forme de résidu sec dans un évaporateur rotatif à 40°C environ à condition d'avoir neutralisé le milieu, soit précipité en milieu solvant. Dans tous les cas, on constate que la composition oligopeptidique obtenue comporte peu d'acides aminés libres, est riche en oligopeptides ayant un poids moléculaire compris entre 1000 et 5000 et renferme plus de 30% des liaisons cystine contenues dans le matériau kératinique de départ.

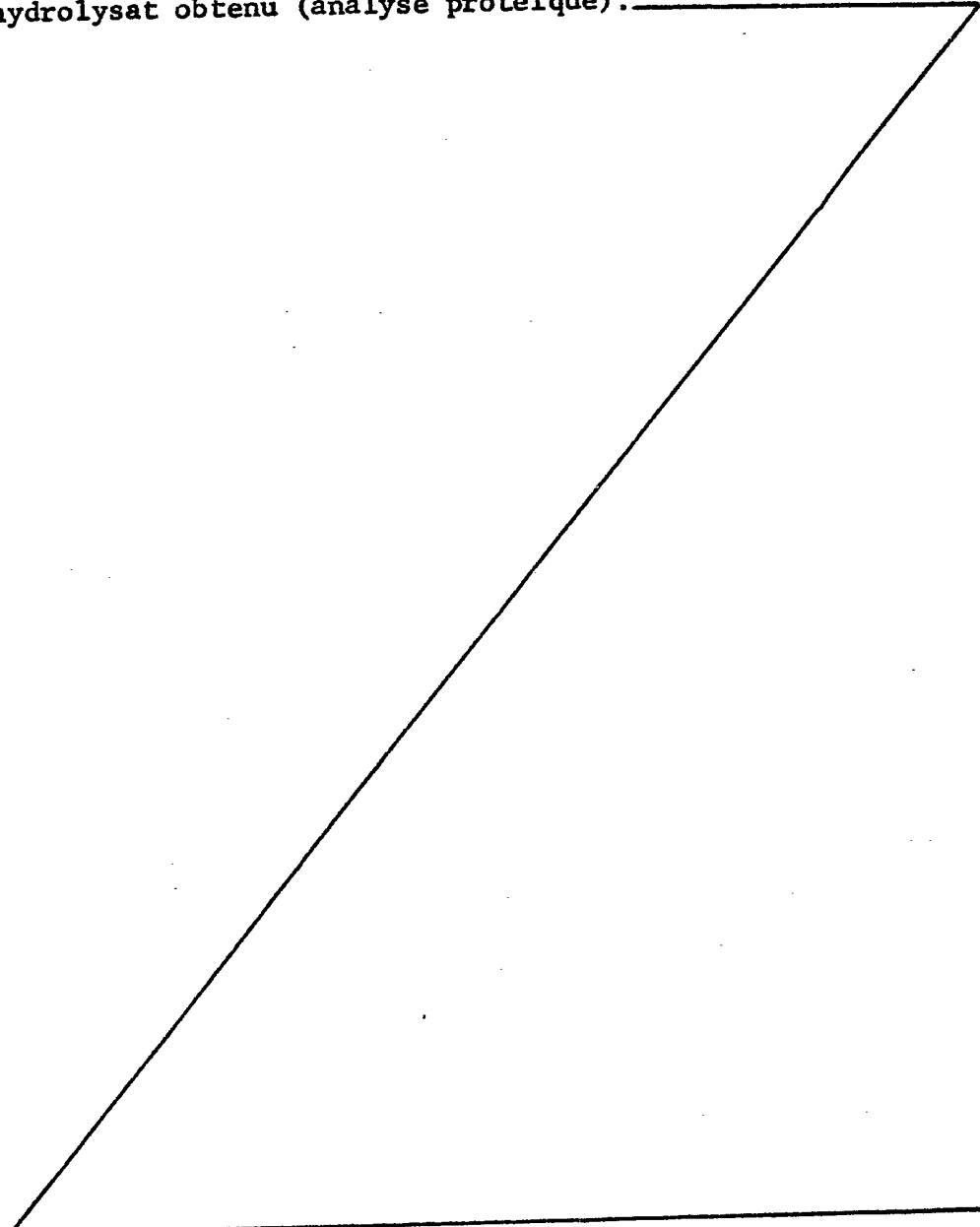
La présente invention a également pour objet le produit industriel nouveau que constitue une composition oligopeptidique obtenue par le procédé ci-dessus défini, caractérisée par le fait que plus de 75% en poids des oligopeptides, qu'elle contient, ont un poids moléculaire compris entre 1000 et 5000, la composition contenant, en outre, plus de 30% en poids des groupes cystine contenus dans le matériau kératinique ayant servi de matière première.

La présente invention a également pour objet l'utilisation de la composition oligopeptidique ci-dessus définie pour le traitement des cheveux ou de la peau ou dans l'industrie alimentaire.

Pour mieux faire comprendre l'objet de l'invention, on va en décrire maintenant, à titre d'exemples purement

illustratifs et non limitatifs, plusieurs modes de mise en oeuvre.

Dans ces exemples, le rendement de la digestion enzymatique est calculé par analyse (chromatographie sur résine échangeuse d'ions), après hydrolyse, d'une partie aliquote du surnageant filtré et centrifugé. Dans chaque exemple, on a comparé le rendement de digestion enzymatique pour le matériau kératinique traité avec ou sans sensibilisation préalable. De plus, on a comparé le taux de cystine initialement présent dans la kératine naturelle traitée et le taux de cystine dans l'hydrolysat obtenu (analyse protéique).



Exemple 1 :a) Première étape : Sensibilisation

100 g de cheveux coupés (portions de 2 cm de long) sont immersés dans deux litres de diméthyl-formamide pré-
 5 chauffée à 120°C.

La solution est laissée durant deux heures à 120°C.

Les cheveux sont ensuite filtrés ; ils sont rincés plusieurs fois à l'eau déminéralisée, puis à l'alcool et à l'éther. Ils sont séchés à température ambiante.

10 b) Deuxième étape : Digestion enzymatique

Une solution enzymatique contenant de la Proteinase "PSF 2019" (Société ORIL - PARIS) est préparée juste avant l'emploi. Sa formule est la suivante :

- Proteinase "PSF 2019" purifiée

15	(11 000 unités Anson/mg)	3,2	g
	- Acide borique	22,5	g
	- Soude normale	130	ml
	- MgCl ₂ , 6H ₂ O	0,03	g
	- Eau déminéralisée...qsp...	2000,00	ml

20 Les cheveux présensibilisés à la diméthyl-formamide sont immersés dans la solution enzymatique portée à 40°C. Un agitateur à pales assure une agitation continue.

La digestion dure quatre jours. Après filtration du résidu insoluble, la solution est neutralisée.

25 Les résultats obtenus sont les suivants :

1) rendement de la digestion enzymatique :

- cheveux témoins non sensibilisés : 5 %
- cheveux sensibilisés : 38 %

2) caractérisation de l'hydrolysat de kératine :

- 30 - taux de cystine dans l'hydrolysat :
 56×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale
- taux de cystine dans la kératine initiale :
 62×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

35

Exemple 2 :a) Première étape : Sensibilisation

On utilise un mode opératoire identique à celui de l'exemple 1, mais on maintient la sensibilisation pendant 40 quatre heures.

b) Deuxième étape : Digestion enzymatique

On utilise un mode opératoire identique à celui de l'exemple 1.

Les résultats obtenus sont les suivants :

5

1) rendement de la digestion enzymatique :

- cheveux témoins non sensibilisés 5 %
- cheveux sensibilisés 95 %

10 2) caractérisation de l'hydrolysat de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysat :
 50×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale
- taux de cystine dans la kératine initiale :
 62×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

15

Exemple 3 :

a) Première étape : Sensibilisation

On utilise un mode opératoire identique à celui de l'exemple 1, mais on maintient la sensibilisation pendant six heures.

20

b) Deuxième étape : Digestion enzymatique

On utilise un mode opératoire identique à celui de l'exemple 1.

Les résultats obtenus sont les suivants :

25

1) rendement de la digestion enzymatique :

- cheveux témoins non sensibilisés 5 %
- cheveux sensibilisés 98 %

30 2) caractérisation de l'hydrolysat de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysat :
 35×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale
- taux de cystine dans la kératine initiale :
 62×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

30

Exemple 4 :

35

a) Première étape : Sensibilisation

100 g de cheveux coupés (portions de 2 cm de long) sont immersés dans deux litres de diméthyl-formamide préchauffé à 140 °C.

La solution est portée à ébullition et le reflux

40

est maintenu pendant une heure.

Les cheveux sont filtrés; ils sont rincés plusieurs fois à l'eau déminéralisée, puis à l'alcool et à l'éther. Ils sont séchés à température ambiante.

b) Deuxième étape : Digestion Enzymatique

5 On utilise un mode opératoire identique à celui de l'exemple 1.

Les résultats obtenus sont les suivants :

1) rendement_de_la_digestion_enzymatique :

- cheveux témoins non sensibilisés 5 %
- cheveux sensibilisés 81 %

10 2) caractérisation_de_l'hydrolysat_de_kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysat :
 25×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

15 - taux de cystine dans la kératine initiale :
 62×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

Exemple 5 :

a) Première étape : Sensibilisation

20 100 g de cheveux coupés (portions de 2 cm de long) sont immergés dans deux litres d'une solution constituée de 1 500 ml de diméthyl-formamide et de 500 ml d'eau déminéralisée.

25 Cette solution est portée à ébullition et le reflux est maintenu durant trois heures.

Les cheveux sont filtrés ; ils sont rincés plusieurs fois à l'eau déminéralisée, puis à l'alcool et à l'éther. Ils sont séchés à température ambiante.

b) Deuxième étape : Digestion enzymatique

30 On utilise un mode opératoire identique à celui de l'exemple 1.

Les résultats obtenus sont les suivants :

1) rendement_de_la_digestion_enzymatique :

- cheveux témoins non sensibilisés 5 %
- cheveux sensibilisés 59 %

35 2) caractérisation_de_l'hydrolysat_de_kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysat :
 42×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

- taux de cystine dans la kératine initiale :
 62×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

Exemple 6 :

5 a) Première étape : Sensibilisation

100 g de cheveux coupés (portions de 2 cm de long) sont immersés dans deux litres de méthanol.

La solution est portée à ébullition et le reflux est maintenu durant douze heures.

10 Les cheveux sont filtrés ; ils sont séchés à température ambiante.

b) Deuxième étape : Digestion enzymatique

On utilise un mode opératoire identique à celui de l'exemple 1.

15 Les résultats obtenus sont les suivants :

1) rendement de la digestion enzymatique :

- | | | |
|------------------------------------|----|---|
| - cheveux témoins non sensibilisés | 5 | % |
| - cheveux sensibilisés | 16 | % |

2) caractérisation de l'hydrolysat de kératine :

20 - taux de cystine dans l'hydrolysat :

60×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

- taux de cystine dans la kératine initiale :
 62×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

25

Exemple 7 :

a) Première étape : Sensibilisation

On utilise un mode opératoire identique à celui de l'exemple 6, mais on maintient la sensibilisation pendant vingt quatre heures.

b) Deuxième étape : Digestion enzymatique

On utilise un mode opératoire identique à celui de l'exemple 1.

Les résultats obtenus sont les suivants :

35 1) rendement de la digestion enzymatique :

- | | | |
|------------------------------------|----|---|
| - cheveux témoins non sensibilisés | 5 | % |
| - cheveux sensibilisés | 19 | % |

2) caractérisation de l'hydrolysat de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysat :
 58×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique normale
- 5 - taux de cystine dans la kératine initiale :
 62×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

Exemple 8 :

a) Première étape : Sensibilisation

10 100 g de cheveux coupés (portions de 2 cm de long) sont immersés dans deux litres d'acide formique préchauffé à 90°C.

La solution est portée à ébullition et le reflux est maintenu pendant trente minutes.

15 Les cheveux sont filtrés ; ils sont lavés abondamment à l'eau déminéralisée, puis à l'alcool et à l'éther. Ils sont séchés à température ambiante.

b) Deuxième étape : Digestion enzymatique

On utilise un mode opératoire identique à celui de l'exemple 1.

20 20 Les résultats obtenus sont les suivants :

1) rendement de la digestion enzymatique :

- cheveux témoins non sensibilisés 5 %
- cheveux sensibilisés 14 %

25 25 2) caractérisation de l'hydrolysat de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysat :
 59×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale
- taux de cystine dans la kératine initiale :
 62×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

Exemple 9 :

a) Première étape : Sensibilisation

35 35 100 g de cheveux coupés (portions de 2 cm de long) sont immersés dans deux litres d'acide formique préchauffé à 90°C.

La solution est portée à ébullition et le reflux est maintenu pendant trente minutes.

Les cheveux sont filtrés. Ils sont immersés à nouveau dans deux litres d'acide formique et agités durant 16 heures à température ambiante.

5 Les cheveux sont filtrés ; ils sont lavés abondamment à l'eau déminéralisée, puis à l'alcool et à l'éther. Ils sont séchés à température ambiante.

b) Deuxième étape : Digestion enzymatique

On utilise un mode opératoire identique à celui de l'exemple 1.

10 Les résultats obtenus sont les suivants :

1) Rendement de la digestion enzymatique :

- cheveux témoins non sensibilisés	5	%
- cheveux sensibilisés	23	%

2) Caractérisation de l'hydrolysat de kératine :

15 - taux de cystine dans l'hydrolysat :

57×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

- taux de cystine dans la kératine initiale :

62×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

20

Exemple 10 :

a) Première étape : Sensibilisation

On prépare une solution de bromure de lithium en solubilisant 1 737 g de LiBr dans de l'eau déminéralisée ajustant le volume à deux litres.

100 g de cheveux coupés (portions de 2 cm de long) sont immersés dans les deux litres de solution sensibilisante préchauffée à 90°C.

30 La solution est portée à ébullition et le reflux est maintenu pendant une heure.

Les cheveux sont filtrés ; ils sont lavés abondamment à l'eau déminéralisée chaude, puis à l'alcool et à l'éther. Ils sont séchés à température ambiante.

b) Deuxième étape - Digestion enzymatique

35 On utilise un mode opératoire identique à celui de l'exemple 1.

Les résultats obtenus sont les suivants :

1) Rendement de la digestion enzymatique :

- cheveux témoins non sensibilisés	5	%
- cheveux sensibilisés	75	%

40

2) caractérisation de l'hydrolysat de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysat :
 53×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

5 - taux de cystine dans la kératine initiale :
 62×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

Exemple 11 :a) Première étape : Sensibilisation

10 On prépare une solution de bromure de lithium en solubilisant 1 390 g de LiBr dans de l'eau déminéralisée et en ajustant le volume à deux litres.

15 100 g de cheveux coupés (portions de 2 cm de long) sont immersés dans les deux litres de solution sensibilisante, préchauffée à 90°C.

La solution est portée à ébullition et le reflux est maintenu pendant quatre heures.

20 Les cheveux sont filtrés ; ils sont lavés abondamment à l'eau déminéralisée chaude, puis à l'alcool et à l'éther. Ils sont séchés à température ambiante.

b) Deuxième étape : Digestion enzymatique

On utilise un mode opératoire identique à celui de l'exemple 1.

Les résultats obtenus sont les suivants :

25 1) rendement de la digestion enzymatique :

- | | | |
|------------------------------------|----|---|
| - cheveux témoins non sensibilisés | 5 | % |
| - cheveux sensibilisés | 15 | % |

2) caractérisation de l'hydrolysat de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysat :

30 54×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

- taux de cystine dans la kératine initiale :
 62×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

Exemple 12 :a) Première étape : Sensibilisation

On prépare une solution de bromure de lithium en solubilisant 1 737 g de LiBr dans de l'eau déminéralisée, ajustant le volume à deux litres.

40 100 g de cheveux coupés (portions de 2 cm de long)

sont immersés dans les deux litres de la solution sensibilisante.

La solution est portée à 100°C, puis maintenue à cette température pendant seize heures.

5 Les cheveux sont filtrés ; ils sont lavés abondamment à l'eau déminéralisée chaude, puis à l'alcool et à l'éther. Ils sont séchés à température ambiante.

b) Deuxième étape : Digestion enzymatique

On utilise un mode opératoire identique à celui
10 de l'exemple 1.

Les résultats obtenus sont les suivants :

1) Rendement de la digestion enzymatique :

- cheveux témoins non sensibilisés 5 %
- cheveux sensibilisés 13 %

15 2) Caractérisation de l'hydrolysat de kératine

- taux de cystine dans l'hydrolysat :
 60×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale
- taux de cystine dans la kératine initiale :
 62×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

Exemple 13 :

a) Première étape : Sensibilisation

On utilise un mode opératoire identique à celui
25 de l'exemple 10.

Après reflux d'une heure dans la solution de bromure de lithium, les cheveux sont filtrés puis lavés abondamment à l'eau déminéralisée chaude et à l'alcool.

30 Ils sont ensuite immersés dans deux litres de diméthyldimethyl-formamide préchauffée à 140°C. La solution est portée à ébullition et le reflux est maintenu pendant trente minutes.

Les cheveux sont filtrés ; ils sont rincés plusieurs fois à l'eau déminéralisée, puis à l'alcool et à l'éther. Ils sont séchés à température ambiante.

35 b) Deuxième étape - Digestion enzymatique

On utilise un mode opératoire identique à celui de l'exemple 1.

Les résultats obtenus sont les suivants :

1) Rendement de la digestion enzymatique :

- cheveux témoins non sensibilisés 5 %

- cheveux sensibilisés 91 %

2) caractérisation de l'hydrolysat de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysat :

50×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

5

- taux de cystine dans la kératine initiale :

62×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

Exemple 14 :

10 a) Première étape : Sensibilisation

On prépare une solution de bromure de lithium en solubilisant 1 737 g de LiBr dans de l'eau déminéralisée, en ajustant le volume à deux litres.

100 g de poudre de corne sont immersés dans les deux 15 litres de solution sensibilisante, préchauffée à 90°C.

La solution est portée à l'ébullition et le reflux est maintenu pendant une heure.

20 La poudre de corne est filtrée ; elle est lavée abondamment à l'eau déminéralisée chaude, puis à l'alcool et à l'éther. Elle est séchée à température ambiante.

b) Deuxième étape : Digestion enzymatique

Une solution enzymatique contenant de la protéinase "PSF 2019" (Société ORIL - PARIS) est préparée juste avant l'emploi. Sa formule est la suivante :

25 - Protéinase "PSF 2019" purifiée

(11 000 unités Anson/mg)	2,5	g
--------------------------	-----	---

- Tris(hydroxyméthyl)aminométhane 24,2 g

- HCl (solution normale) 55 ml

- MgCl₂, 6H₂O 0,03 g

30 - Eau déminéralisée...qsp... 2 000 ml

La poudre de corne présensibilisée au bromure de lithium est immersée dans la solution enzymatique portée à 40° C. Un agitateur assure une agitation continue.

La digestion dure quatre jours.

35 Le résidu insoluble est filtré et la solution est neutralisée.

Les résultats obtenus sont les suivants :

1) rendement de la digestion enzymatique :

- poudre de corne témoin non sensibilisée	46	%
--	----	---

5

- poudre de corne sensibilisée	62	%
--------------------------------	----	---

2) caractérisation de l'hydrolysat de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysat :

25×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

10

- taux de cystine dans la kératine initiale :

31×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

Exemple 15 :

a) Première étape : Sensibilisation

15 100 g de poudre de corne sont immersés dans deux litres de diméthyl-formamide, préchauffée à 120°C.

La solution est laissée pendant quatre heures à 120°C.

20 La poudre de corne est filtrée ; elle est rincée plusieurs fois à l'eau déminéralisée, puis à l'alcool et à l'éther. Elle est séchée à température ambiante.

b) Deuxième étape : Digestion enzymatique

Une solution enzymatique contenant de la chymotrypsine est préparée juste avant l'emploi.

25 Sa formule est la suivante :

- Alpha-chymotrypsine (47 u/mg)	1,5	g
- Tris(hydroxyméthyl)aminométhane	24,2	g
- HCl (solution normale)	100	ml
- Eau déminéralisée...qsp...	2000	ml

30 La poudre de corne présensibilisée à la diméthyl-formamide est immersée dans la solution enzymatique portée à 40°C. Un agitateur assure une agitation continue.

La digestion dure quatre jours.

Le résidu insoluble est filtré et la solution est neutralisée.

Les résultats obtenus sont les suivants :

1) rendement de la digestion enzymatique :

- poudre de corne témoin non sensibilisée	18	%
--	----	---

40

- poudre de corne sensibilisée	35	%
--------------------------------	----	---

2) caractérisation de l'hydrolysat de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysat :
 24×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale
- 5 - taux de cystine dans la kératine initiale :
 31×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

Exemple 16 :

a) Première étape : Sensibilisation

10 100 g de poils de lapin propres sont immersés dans deux litres de diméthyl-formamide préchauffée à 120°C.
La solution est laissée pendant trois heures à 120°C.

15 Les poils de lapin sont filtrés ; ils sont rincés plusieurs fois à l'eau déminéralisée, puis à l'alcool et à l'éther. Ils sont séchés à température ambiante.

b) Deuxième étape : Digestion enzymatique

Une solution enzymatique contenant de la Pronase (Koch-Light) est préparée juste avant l'emploi.

20 Sa formule est la suivante :

- Pronase (ex. streptomyces griseus)	2,4	g
- Acide borique (H_3BO_3)	22,5	g
- Soude normale	130	ml
- $MgCl_2$, $6H_2O$	0,03	g
25 - Eau déminéralisée...qsp...	2000	ml

Les poils de lapin présensibilisés à la diméthyl-formamide sont immersés dans la solution enzymatique portée à 40°C. Un agitateur assure une agitation continue.

La digestion dure quatre jours.

30 Le résidu insoluble est filtré et la solution est neutralisée.

Les résultats obtenus sont les suivants :

1) rendement de la digestion enzymatique :

- poils de lapin témoins non sensibilisés 4 %
- poils de lapin sensibilisés 78 %

2) caractérisation de l'hydrolysat de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysat :
 $23,5 \times 10^{-3}$ moles pour 100 g de matière protéique totale.

- taux de cystine dans la kératine initiale :
 31×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

Exemple 17 :

5 a) Première étape : Sensibilisation

On prépare une solution de bromure de lithium en solubilisant 1 737 g de LiBr dans de l'eau déminéralisée, en ajustant le volume à deux litres.

10 100 g de poils de lapin propres sont immersés dans les deux litres de solution sensibilisante, préchauffée à 90°C.

La solution est portée à ébullition et le reflux est maintenu pendant une heure.

15 Les poils de lapin sont filtrés ; ils sont lavés abondamment à l'eau déminéralisée chaude, puis à l'alcool et à l'éther. Ils sont séchés à température ambiante.

b) Deuxième étape : Digestion enzymatique

Une solution enzymatique contenant de la trypsine est préparée juste avant l'emploi.

20 Sa formule est la suivante :

- Trypsine pure (317 u/mg)	15	g
- Acide borique (H_3BO_3)	50	g
- Soude normale	290	ml
- Eau déminéralisée...qsp...	5000	ml

25 Les poils de lapin présensibilisés au bromure de lithium sont immersés dans la solution enzymatique portée à 40°C. Un agitateur assure une agitation continue.

La digestion dure quatre jours.

Le résidu insoluble est filtré et la solution est 30 neutralisée.

Les résultats obtenus sont les suivants :

1) Rendement de la digestion enzymatique :

- poils de lapin témoins non sensibilisés 3 %

35 - poils de lapin sensibilisés 33 %

2) Caractérisation de l'hydrolysat de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysat :
 25×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

- taux de cystine dans la kératine initiale :
 31×10^{-3} mole pour 100 g de matière protéique totale

Exemple 18 :

5 a) Première étape : Sensibilisation

100 g de plumes de volaille (duvet) sont immergés dans deux litres de diméthyl-formamide, préchauffée à 120°C.

La solution est laissée pendant quatre heures à 120°C.

Les plumes sont filtrées ; elles sont rincées plusieurs 10 fois à l'eau déminéralisée, puis à l'alcool et à l'éther. Elles sont séchées à température ambiante.

b) Deuxième étape : Digestion enzymatique

Une solution enzymatique contenant de la Pronase (KOCH-LIGHT) est préparée juste avant l'emploi.

15 Sa formule est la suivante :

- Pronase (ex_streptomyces griseus)	2, 4	g
- Tris(hydroxyméthyl)aminométhane	24, 2	g
- HCl (solution normale)	55	ml
- MgCl ₂ , 6H ₂ O	0,03	g
20 - Eau déminéralisée...qsp...	2 000	ml

Les plumes présensibilisées à la diméthyl-formamide sont immergées dans la solution enzymatique portée à 40°C. Un agitateur assure une agitation continue.

La digestion dure quatre jours.

25 Le résidu insoluble est filtré et la solution est neutralisée.

Les résultats obtenus sont les suivants :

1) rendement de la digestion enzymatique :

- plumes témoins non sensibilisées	10 %
30 - plumes sensibilisées	27 %

2) caractérisation de l'hydrolysat de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysat :
31,5 $\times 10^{-3}$ mole pour 100 g de matière protéique totale
35 - taux de cystine dans la kératine initiale :
34 $\times 10^{-3}$ mole pour 100 g de matière protéique totale

Les hydrolysats de protéines ont une influence bénéfique sur le cheveu lorsqu'ils entrent dans la composition 40 de produits de soin ou de traitement. Les effets physiolo-

giques et cosmétiques positifs s'expliquent par la formation d'un dépôt plus ou moins ordonné au niveau de la cuticule du cheveu, qui le protège ainsi des attaques chimiques ou physico-chimiques et qui lui transfère des vertus coiffantes appréciables. Les hydrolysats de kératine qui ont une formule riche en soufre, sont, de par leur composition chimique, très proches des cheveux et constituent donc les protéines idéales pour les soins capillaires.

On va donner ci-après, deux exemples d'utilisation
10 des hydrolysats de kératine selon l'invention.

Exemple 19 : Lotion vitalisante

La lotion a la formulation suivante :

- Hydrolysat de kératine.....	1	g
- Ether oléique polyoxyéthyléné à 20 moles 15 d'oxyde d'éthylène (vendu sous le nom de "BRIJ 98" par la société ATLAS).....	0,1	g
- Acide acétique...q.s.p.....	pH 7	
- Colorant.....	0,1	g
- Parfum.....	0,1	g
20 - Alcool (à 96°).....	10	ml
- Eau déminéralisée...q.s.p.....	100	ml

La lotion est appliquée sur les cheveux. Un léger massage permet de bien répartir le liquide. Le séchage s'effectue à température ambiante ou sous casque.

25 Exemple 20 : Lotion à rincer

La lotion a la formulation suivante :

- Hydrolysat de kératine.....	1	g
- Ether oléique polyoxyéthyléné à 20 moles d'oxyde d'éthylène (vendu sous le nom de "BRIJ 98" par la société ATLAS).....	0,1	g
- Acide acétique...q.s.p.....	pH 7	
- Colorant.....	0,1	g
- Parfum.....	0,1	g
- Eau déminéralisée...q.s.p.....	100	ml

35 Cette lotion est appliquée sur les cheveux propres de manière homogène. Après une pose d'environ 5 mn, la chevelure est rincée à l'eau et séchée sous casque.

On a comparé l'effet des hydrolysats de kératine selon l'invention et des hydrolysats de kératine de l'état de 40 la technique. A cet effet, on a étudié les microstructures

déposées en surface et on a comparé, dans les lotions des exemples 19 et 20, trois types d'hydrolysats de kératine : l'hydrolysat préparé selon l'exemple numéro 2 de la présente demande de brevet, un hydrolysat chlorhydrique de kératine, 5 et un hydrolysat enzymatique préparé à partir d'une kératine dégradée pauvre en cystine.

Dans l'échelle arbitraire utilisée, le domaine cosmétique se situe entre 0 et 50. Plus le nombre est proche de 0, meilleure est la qualité du dépôt.

10

	Hydrolysat utilisé	Lotion vitalisante appliquée sur cheveu décoloré (ex. 19)	Lotion à rincer appliquée sur cheveu décoloré (ex. 20)
15	Hydrolysat de kératine préparé selon l'exemple 2 - riche en cystine (1000 < Poids moléculaire < 5000)	19	11
20	Hydrolysat chlorhydrique (Poids moléculaire moyen \approx 130)	48	31
25	Hydrolysat enzymatique, de kératine dégradée - pauvre en cystine (1000 < Poids moléculaire < 5000)	65	49

Il apparaît que l'hydrolysat de kératine préparé selon l'exemple 2 de la présente demande de brevet est celui dont 30 le dépôt est le plus cosmétique. Le cheveu ainsi traité n'est pas alourdi par le dépôt et acquiert des qualités appréciables.

REVENDICATIONS

1 - Procédé de préparation d'une composition oligopeptidique par hydrolyse d'un matériau kératinique, ce procédé comportant un traitement par des enzymes protéolytiques et/ou 5 kératolytiques, caractérisé par le fait qu'avant le traitement enzymatique, on soumet le matériau kératinique à un traitement de sensibilisation réalisé au moyen d'au moins un agent de sensibilisation pris dans le groupe formé par les électrolytes agissant en milieu aqueux à une concentration supérieure ou 10 égale à 8 moles par litre et les solvants polaires, ou, dans le cas où le matériau kératinique est constitué de kératine à cuticule, soit par le traitement de sensibilisation précité, soit par un traitement par au moins un agent décuticulant pris dans le groupe formé par les ultrasons et l'acide formique à une 15 concentration supérieure à 90 % en poids dans le milieu de traitement.

2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'électrolyte utilisé est le bromure de lithium.

3 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé 20 par le fait que les solvants polaires constituent pendant le traitement de sensibilisation au moins 75 % en poids du milieu, où s'effectue le traitement.

4 - Procédé selon la revendication 3, caractérisé par le fait que le solvant polaire est pris dans le groupe formé par le diméthyl-formamide et le méthanol. 25

5 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que le traitement de sensibilisation réalisé au moyen d'au moins un électrolyte et/ou d'au moins un solvant polaire, s'effectue pendant un temps supérieur à 30mm 30 et à une température comprise entre la température ambiante et la température de reflux du milieu à pression atmosphérique.

6 - Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'agent décuticulant est l'acide formique, caractérisé par le fait que le traitement de sensibilisation s'effectue pendant un 35 temps supérieur à 30 mm et à une température comprise entre la température ambiante et la température de reflux à la pression atmosphérique.

7 - Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'agent décuticulant est une émission d'ultrasons, caractérisé 40 par le fait que les ultrasons ont une fréquence comprise entre

20 KHz et 70 KHz et un temps d'action supérieur à 30mm, la puissance dissipée étant comprise entre 50 et 150 watts par dm³ traité.

8 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, 5 caractérisé par le fait que le traitement enzymatique postérieur au traitement de sensibilisation est réalisé à un pH inférieur ou égal à 9, à une température inférieure à 50°C et avec une concentration active d'enzymes.

9 - Procédé selon la revendication 8, caractérisé 10 par le fait que le traitement enzymatique a une durée comprise entre 20 h et 90 h.

10 - Composition oligopeptidique obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée par le fait qu'au moins 75 % en poids des oligopeptides qu'elle 15 contient ont un poids moléculaire compris entre 1 000 et 5 000, la composition contenant, en outre, au moins 30 % en poids des groupes cystine contenus dans le matériau kératinique ayant servi de matière première.

11 - Utilisation de la composition selon la revendication 10 pour le traitement des cheveux ou de la peau ou dans l'industrie alimentaire.