

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 Peuscet, 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
5 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
10 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 protéinique constitué par la kératine servant de matière première doit être fractionné en chaînes oligopeptidiques contenant plu-
15 sieurs 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
20 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
25 premières kératiniques non dégradées, par exemple les soies de porc, les plumes de volaille ou la corne, soit à partir de produits résiduels 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
30 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, papaïne) n'ont aucune ac-
35 tivité 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 kératolytiques, comme par exemple les enzymes extraits des différentes souches de "Kératomices"
40 (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 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 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 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, 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 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 H_2S , de lanthionine, de lysinoalanine et de cystéine. 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 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 surprenante, que l'on pouvait obtenir une action d'hydrolyse enzymatique avec un bon rendement sans détruire notablement 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 protéiques de la kératine, soit encore, dans le cas où le matériau kératinique comporte une cuticule enveloppant le produit kératinique proprement dit, avec un agent décuticulant.

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 en milieu aqueux à une concentration supérieure ou égale
10 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 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
35 ambiante et la température de reflux à la pression atmosphérique.

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 dm^3 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'hydrolysats obtenu peut être, soit utilisé sous forme de solution après ajustement du pH, soit lyophilisé, 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.

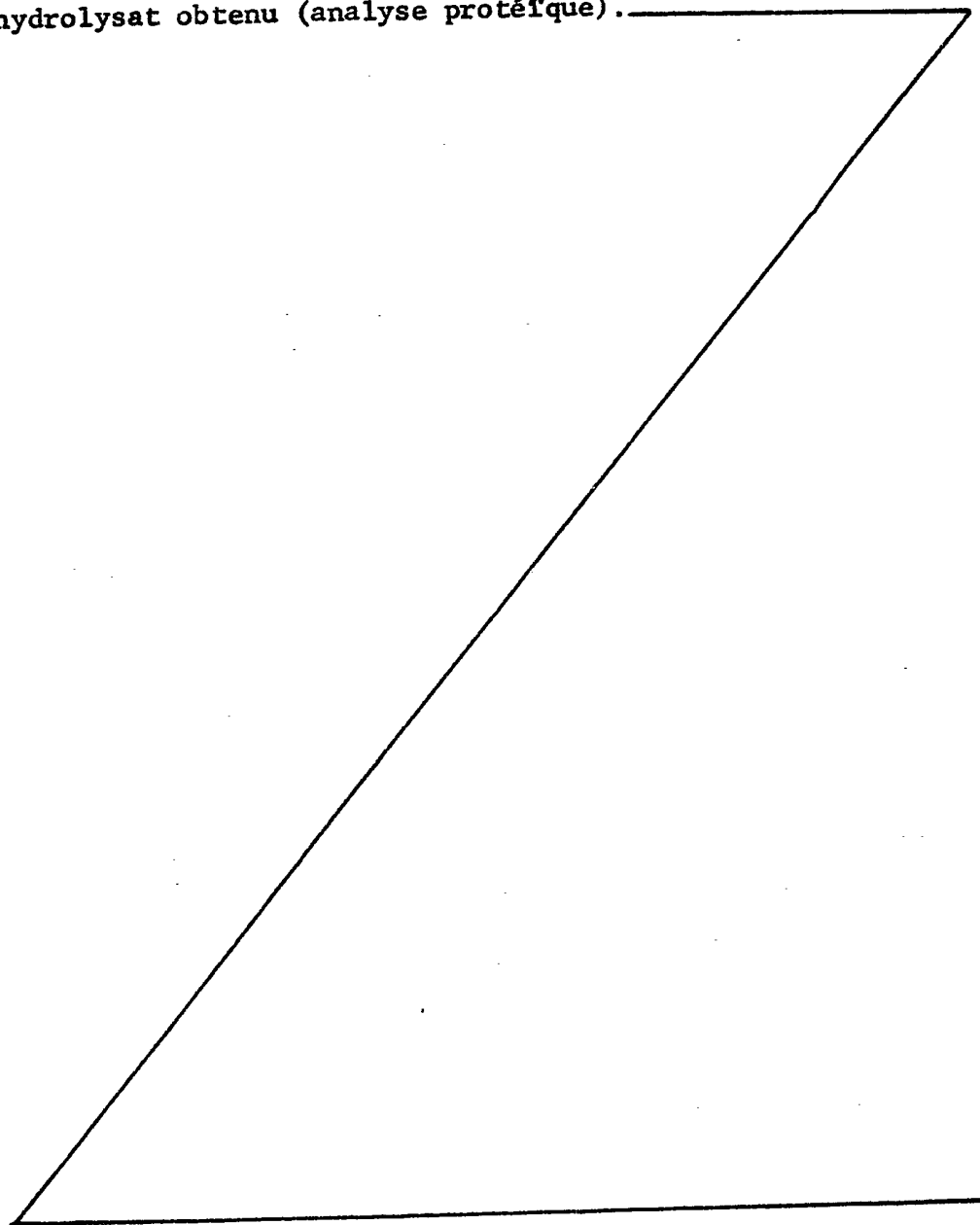
La présente invention a également pour objet le produit industriel nouveau que constitue une composition oligopeptidique obtenue par le procédé ci-dessus défini, caractérisée par le fait que plus de 75% en poids des oligopeptides, qu'elle contient, ont un poids moléculaire compris entre 1000 et 5000, 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'hydrolysate obtenu (analyse protéique).
- 5
- 10



Exemple 1 :a) Première étape : Sensibilisation

100 g de cheveux coupés (portions de 2 cm de long)
sont immergés dans deux litres de diméthyl-formamide pré-
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.

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	
(11 000 unités Anson/mg)	3,2 g
- Acide borique	22,5 g
- Soude normale	130 ml
- $MgCl_2, 6H_2O$	0,03 g
- Eau déminéralisée...qsp...	2000,00 ml

Les cheveux présensibilisés à la diméthyl-formamide
sont immergés 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.

Les résultats obtenus sont les suivants :

1) rendement de la digestion enzymatique :

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

2) caractérisation de l'hydrolysate de kératine :

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

Exemple 2 :a) Première étape : Sensibilisation

On utilise un mode opératoire identique à celui de
l'exemple 1, mais on maintient la sensibilisation pendant
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'hydrolysate de kératine :
- taux de cystine dans l'hydrolysate :
 - 50 x 10⁻³ mole pour 100 g de matière protéique totale
 - taux de cystine dans la kératine initiale :
 - 62 x 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'hydrolysate de kératine :
- taux de cystine dans l'hydrolysate :
 - 35 x 10⁻³ mole pour 100 g de matière protéique totale
 - taux de cystine dans la kératine initiale :
 - 62 x 10⁻³ mole pour 100 g de matière protéique totale

Exemple 4 :

35 a) Première étape : Sensibilisation

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

40 La solution est portée à ébullition et le reflux 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 :

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

2) caractérisation de l'hydrolysate de kératine :

15 - taux de cystine dans l'hydrolysate :
25 x 10⁻³ mole pour 100 g de matière protéique totale
- taux de cystine dans la kératine initiale :
62 x 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 :

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

2) caractérisation de l'hydrolysate de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysate :
42 x 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 immergés 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'hydrolysate de kératine :

- 20 - taux de cystine dans l'hydrolysate :
 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.

30

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 x 10⁻³ mole pour 100 g de matière
protéique normale
- taux de cystine dans la kératine initiale :
62 x 10⁻³ mole pour 100 g de matière
protéique totale

Exemple 8 :a) Première étape : Sensibilisation

100 g de cheveux coupés (portions de 2 cm de long)
sont immergés 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 lavés abondam-
ment 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.

Les résultats obtenus sont les suivants :

1) rendement de la digestion enzymatique :

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

2) caractérisation de l'hydrolysat de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysat :
59 x 10⁻³ mole pour 100 g de matière protéi-
que totale
- taux de cystine dans la kératine initiale :
62 x 10⁻³ mole pour 100 g de matière protéi-
que totale

Exemple 9 :a) Première étape : Sensibilisation

100 g de cheveux coupés (portions de 2 cm de long)
sont immergés 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 immergés à nouveau dans deux litres d'acide formique et agités durant 16 heures à température ambiante.

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.

Les résultats obtenus sont les suivants :

1) rendement de la digestion enzymatique :

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

2) caractérisation de l'hydrolysate de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysate :	
57 x 10 ⁻³ mole pour 100 g de matière protéique totale	
- taux de cystine dans la kératine initiale :	
62 x 10 ⁻³ mole pour 100 g de matière protéique totale	

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 immergés 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.

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 :

1) rendement de la digestion enzymatique :

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

2) caractérisation de l'hydrolysat de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysat :

53 x 10⁻³ mole pour 100 g de matière
protéique totale

5 - taux de cystine dans la kératine initiale :

62 x 10⁻³ mole pour 100 g de matière
protéique totaleExemple 11 :a) Première étape : Sensibilisation10 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 immergés 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 abondam-
ment à l'eau déminéralisée chaude, puis à l'alcool et à
l'éther. Ils sont séchés à température ambiante.b) Deuxième étape : Digestion enzymatiqueOn 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 :

30 - taux de cystine dans l'hydrolysat :

54 x 10⁻³ mole pour 100 g de matière protéique
totale

- taux de cystine dans la kératine initiale :

62 x 10⁻³ mole pour 100 g de matière protéique
totale35 Exemple 12 :a) Première étape : SensibilisationOn 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 immergés 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

10 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 | 13 | % |

15 2) caractérisation de l'hydrolysate de kératine

- taux de cystine dans l'hydrolysate :

60 x 10⁻³ mole pour 100 g de matière protéique totale

- taux de cystine dans la kératine initiale :

20 62 x 10⁻³ mole pour 100 g de matière protéique totale

Exemple 13 :

a) Première étape : Sensibilisation

25 On utilise un mode opératoire identique à celui 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 immergés dans deux litres de diméthyl-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 :

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

Exemple 14 :

10 a) Première étape : Sensibilisation

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

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

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

La poudre de corne est filtrée ; elle est lavée abon-
 damment à l'eau déminéralisée chaude, puis à l'alcool et à
 20 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
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,03	g
30 - Eau déminéralisée...qsp...	2 000	ml

La poudre de corne présensibilisée au bromure de li-
 thium est immergée 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'hydrolysate de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysate :
25 x 10⁻³ mole pour 100 g de matière protéique totale
- 10 - taux de cystine dans la kératine initiale :
31 x 10⁻³ mole pour 100 g de matière protéique totale

Exemple 15 :

a) Première étape : Sensibilisation

- 15 100 g de poudre de corne sont immergés 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 immergée 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 18 %
- 40 - poudre de corne sensibilisée 35 %

2) caractérisation de l'hydrolysat de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysat :

24 x 10⁻³ mole pour 100 g de matière protéique totale

5

- taux de cystine dans la kératine initiale :

31 x 10⁻³ mole pour 100 g de matière protéique totaleExemple 16 :a) Première étape : Sensibilisation

10

100 g de poils de lapin propres sont immergés 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 ₃ BO ₃)	22,5	g
- Soude normale	130	ml
- MgCl ₂ , 6H ₂ O	0,03	g
- Eau déminéralisée...qsp...	2000	ml

45

Les poils de lapin présensibilisés à la diméthyl-formamide sont immergés 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 :

35

- 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 x 10⁻³ moles pour 100 g de matière protéique totale.

40

- 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 immergés 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 immergés 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	3	%
- poils de lapin sensibilisés	33	%

2) caractérisation de l'hydrolysate de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysate :
 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 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'hydrolysate de kératine :

- taux de cystine dans l'hydrolysate :
 $31,5 \times 10^{-3}$ mole pour 100 g de matière protéique totale
- 35 - taux de cystine dans la kératine initiale :
 34×10^{-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 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 des hydrolysats de kératine selon l'invention.

Exemple 19 : Lotion vitalisante

La lotion a la formulation suivante :

- Hydrolysats 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
- 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.

Exemple 20 : Lotion à rincer

La lotion a la formulation suivante :

- Hydrolysats 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

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 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, 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

	Hydrolysats utilisés	Lotion vitalisante appliquée sur cheveu décoloré (ex. 19)	Lotion à rincer appliquée sur cheveu décoloré (ex. 20)
15	Hydrolysats de kératine préparés selon l'exemple 2 - riches en cystine ($1000 < \text{Poids moléculaire} < 5000$)	19	11
20	Hydrolysats chlorhydriques ($\text{Poids moléculaire moyen} \approx 130$)	48	31
25	Hydrolysats enzymatiques, de kératine dégradée - pauvres en cystine ($1000 < \text{Poids moléculaire} < 5000$)	65	49

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

30

REVENDEICATIONS

- 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 dm^3 traité.

5 8 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, 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.

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

15 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 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.

20 11 - Utilisation de la composition selon la revendication 10 pour le traitement des cheveux ou de la peau ou dans l'industrie alimentaire.