

MARIA WALCZYCKA, TADEUSZ KOŁCZAK

## **WPŁYW pH I CHLORKU SODU NA DENATURACJĘ CIEPLNĄ OKSY- I METHEMOGLOBINY**

### **Streszczenie**

Celem badań było określenie wpływu pH oraz dodatku chlorku sodu na denaturację cieplną oksy- i methemoglobiny krwi bydlęcej.

Otrzymaną z krwi bydlęcej oksyhemoglobinę przekształcano w methemoglobinę, stosując utlenianie barwnika przy użyciu sześciocyjanożelazianu(II) potasu. Określano temperaturę denaturacji obu form barwnika hemowego krwi w roztworach wodnych o pH = 5,0 – 7,0 oraz w roztworach o pH = 5,6 i pH = 6,8, zawierających dodatek NaCl w stężeniach od 0 do 6%. Do oznaczania zastosowano analizę widm absorpcji ogrzewanych roztworów barwnika. Zanik pików absorpcji charakterystycznych dla danej formy barwnika był wskaźnikiem jego denaturacji cieplnej. Wartość pH roztworu miała istotny wpływ na temperaturę denaturacji zarówno oksy-, jak i methemoglobiny. Temperatura denaturacji obu form barwnika rosła wraz ze wzrostem wartości pH roztworu. Zależność temperatury denaturacji od pH roztworu była większa w przypadku oksyhemoglobiny niż methemoglobiny. W roztworach o pH 5,4-5,8 oba barwniki ulegały denaturacji w temp. od 64 do 66°C. Dodatek NaCl do roztworu barwników obniżał temperaturę ich denaturacji, ale znacznie większy spadek temperatury denaturacji zachodził w roztworach o pH= 5,6 niż w roztworach o pH = 6,8.

**Słowa kluczowe:** oksyhemoglobina, methemoglobina, denaturacja cieplna, pH, chlorek sodu.

### **Wprowadzenie**

Hemoglobina, czerwony barwnik hemowy występujący w erytrocytach zwierząt, działa przyżyciowo jako przenośnik tlenu we krwi oraz odgrywa decydującą rolę w transporcie dwutlenku węgla i jonów wodorowych [19, 23]. Po wykrwawieniu zwierzęcia w czasie uboju, w jego narządach wewnętrznych i mięśniach szkieletowych pozostaje zmienna ilość hemoglobiny. Jej zawartość w tkankach zależy od stopnia wykrwawienia. Upust powyżej 50% krwi krążącej przyjmowany jest za wskaźnik dobrego wykrwawienia. Krew zostaje zatrzymana głównie w takich narządach wewnętrznych, jak: serce, wątroba, płuca i przewód pokarmowy. Wskaźnikiem wielkości resztkowej krwi w mięśniach jest stosunek hemoglobiny do mioglobiny

---

*Dr inż. M. Walczycka, prof. dr hab. inż. T. Kołczak; Katedra Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych, Wydział Technologii Żywności, Akademia Rolnicza w Krakowie, Al. 29 Listopada 52; 31-425 Kraków  
e-mail: mariawalczycka@poczta.onet.pl*

(barwnika hemowego mięśni). Najwięcej krwi pozostaje w mięśniu sercowym – hemoglobina stanowi ponad 50% barwników hemowych, najmniej w mięśniach o przewodzie białych włókien mięśniowych – poniżej 10% ogólnej ilości barwników hemowych [11]. Przemiany, jakim ulega hemoglobina w czasie składowania oraz ogrzewania krwi i mięsa wpływają na ich barwę, jakość i przydatność przetwórczą.

Hemoglobina może występować w surowcach rzeźnych w formie zredukowanej w postaci purpurowoczerwonej dezoksyhemoglobiny i jasnoczerwonej oksyhemoglobiny oraz w formie utlenionej w postaci brunatnej methemoglobiny. Wzajemny stosunek wymienionych form barwnika zależy od dostępności tlenu (lub powietrza), aktywności redukującej wewnętrznego środowiska oraz obecności czynników utleniających [3, 5]. Bezpośrednio po wykrwawieniu zwierzęcia hemoglobina w pozyskanej krwi występuje w postaci oksyhemoglobiny. Dopiero gdy ciśnienie parcjalne tlenu zmniejszy się do wartości poniżej 3,5 kPa, ponad 50% oksyhemoglobiny ulega dysocjacji do dezoksyhemoglobiny [7]. Do czynników sprzyjających procesowi utleniania obu postaci zredukowanej hemoglobiny należą obecność soli, oddziaływanie promieniowania świetlnego i ultrafioletowego, a także wartość pH [15, 23]. W środowisku o pH mniejszym od 5,0 wszystkie formy hemoglobiny ulegają rozkładowi do składowych hemu i globiny [12, 22].

Krew wykorzystywana jako surowiec w produkcji krwistych przetworów mięsnych jest wstępnie ogrzewana. Pod wpływem podwyższonej temperatury hemoglobina ulega denaturacji cieplnej do szarobrazowego barwnika globinohemichromogenu. Według Pezackiego [21] krew powinna być wstępnie ogrzewana do temp. 80°C. W dostępnej literaturze nie spotkano informacji dotyczących temperatury denaturacji hemoglobiny i wpływu na nią różnych czynników technologicznych i środowiskowych. Kilka badań poświęcono natomiast stabilności cieplnej mioglobiny. Stwierdzono, że stabilność cieplna mioglobiny zależy od właściwości jakościowych surowca, charakteru ligandu w szóstej pozycji koordynacyjnej pierścienia porfirynowego hemu i stopnia utlenienia żelaza [9, 24]. Stopień denaturacji mioglobiny zwiększa się ze wzrostem temperatury ogrzewania [8]. Według Wrighta [27], znacząca ilość mioglobiny mięsa wołowego ulega denaturacji w temp. niższej niż 60°C. Zdaniem Lawrie'ego [13], mioglobina ulega całkowitej denaturacji w temp. wyższej niż 80°C. Według Lytrasa i wsp. [14], po ogrzaniu mięsa wołowego do temp. 70°C pozostaje tylko 1% rozpuszczalnej niezdenaturowanej mioglobiny. Najbardziej termostabilną postacią mioglobiny jest metmioglobina [17]. W wyższych zakresach pH stopień denaturacji cieplnej mioglobiny jest mniejszy [26]. Dodatek soli powoduje obniżenie temperatury denaturacji barwnika [25, 14].

Celem badań było określenie wpływu pH oraz dodatku chlorku sodu na denaturację cieplną oksy- i methemoglobiny krwi bydlęcej.

### Materiał i metody badań

Materiałem do otrzymywania wodnych roztworów oksyhemoglobiny i methemoglobiny była świeża krew pobierana w czasie wykrwawiania krów rzeźnych w zakładzie mięsnym Krakmeat w Krakowie. Krew pobierano do polietylenowych pojemników zawierających niewielką ilość heparyny. Krew wirowano w wirówce K-24 firmy Janetkzy (Niemcy) w temp. 4°C przy 5 000 g przez 10 min. Osad czerwonych krwinek przemywano 5-krotnie 0,9% roztworem NaCl i hemolizowano przy użyciu wody redestylowanej, dodając do 1 objętości krwinek 5 objętości wody. Hemolizat sączono pod zmniejszonym ciśnieniem przez warstwę Cellite 330 o grubości 2 cm. Oznaczano pH hemolizatu oraz, po odpowiednim rozcieńczeniu wodą, dokonywano pomiaru widm absorpcji. Wartość pH oczyszczonych hemolizatów wynosiła 6,80-6,82. Maksima absorpcji w zakresie widma widzialnego występowały przy długościach fali 540 nm i 578 nm. Na podstawie przebiegu krzywych absorpcji przyjęto zgodnie z McLoughlin [16], że otrzymane hemolizaty są roztworami wodnymi oksyhemoglobiny.

Oksyhemoglobinę w wodnym roztworze, otrzymaną w powyższy sposób, utleniało do methemoglobiny zgodnie z metodą opisaną przez Millara i wsp. [18]. W tym celu w 50 cm<sup>3</sup> nierozcieńczonego hemolizatu rozpuszczano 520 mg sześciocyjanożelazianu(II) potasu – K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]. Otrzymany roztwór sączono w warunkach podciśnienia przez warstwę żelu Sephadex G-25 o średnicy 3 cm i grubości 10 cm. Po odpowiednim rozcieńczeniu filtratu wodą dokonywano pomiaru widma absorpcji. Maksima absorpcji filtratów w zakresie widma widzialnego występowały przy długościach fali 500 nm i 632 nm. Na podstawie przebiegu krzywych absorpcji przyjęto zgodnie z MacLean [15], że otrzymane filtry są wodnymi roztworami methemoglobiny.

W celu określenia temperatury denaturacji cieplnej barwników oczyszczone hemolizaty (oksyhemoglobina) i filtry (methemoglobina) rozcieńczano wodą redestylowaną odpowiednio: roztwory oksyhemoglobiny do otrzymania wartości współczynnika absorpcji przy długości fali 540 nm w zakresie  $E_{1\text{ cm}} = 0,4-0,5$ , roztwory methemoglobiny do otrzymania wartości współczynnika absorpcji przy długości fali 500 nm w zakresie  $E_{1\text{ cm}} = 0,6-0,7$ .

Analiza wpływu pH na denaturację cieplną barwników obejmowała zakres wartości 5,0–7,0. Wybrane wartości pH są charakterystyczne dla mięsa wołowego o właściwych cechach jakościowych oraz krwi w okresie po wykrwawieniu zwierzęcia. Żądane pH ustalano, dodając do rozcieńczonych roztworów barwników: 0,05 M kwas cytrynowy (pH < 6,0) lub 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH > 6,0). Wartości pH roztworów różnicowano co 0,2 jednostki.

W celu określenia wpływu NaCl na denaturację cieplną barwników próbki przygotowywano w następujący sposób: do rozcieńczonych roztworów barwników o pH = 5,6 oraz 6,8 dodawano NaCl (*in substancja*) do uzyskania stężenia soli w

roztworach w zakresie 0–6%, przy czym stężenie soli w kolejnych roztworach różniło się co 1%.

Temperaturę denaturacji określano na podstawie analizy widm absorpcji w czasie podgrzewania roztworów. W tym celu rozcieńczony roztwór barwnika o znanym pH, i/lub stężeniu soli, wlewano do kuwety o grubości 1 cm. Kuwetę umieszczano w komorze spektrofotometru UV-VIS Scanning Spectrophotometer, typu 210, wyposażonego w przystawkę TCC-260 (firmy Shimadzu) z ogrzewaniem i kontrolą temperatury roztworu. Zapisu widm absorpcji dokonywano, podnosząc temp. roztworu w kuwecie co 2°C w zakresie 20–60°C, a następnie co 1°C do temp. 70°C. Temperaturę, w której obserwowano zanik pików absorpcji charakterystycznych dla danej formy barwnika, przyjmowano za temperaturę jego denaturacji.

Badania przeprowadzono na wodnych roztworach obu barwników hemowych krwi w trzech niezależnych powtórzeniach.

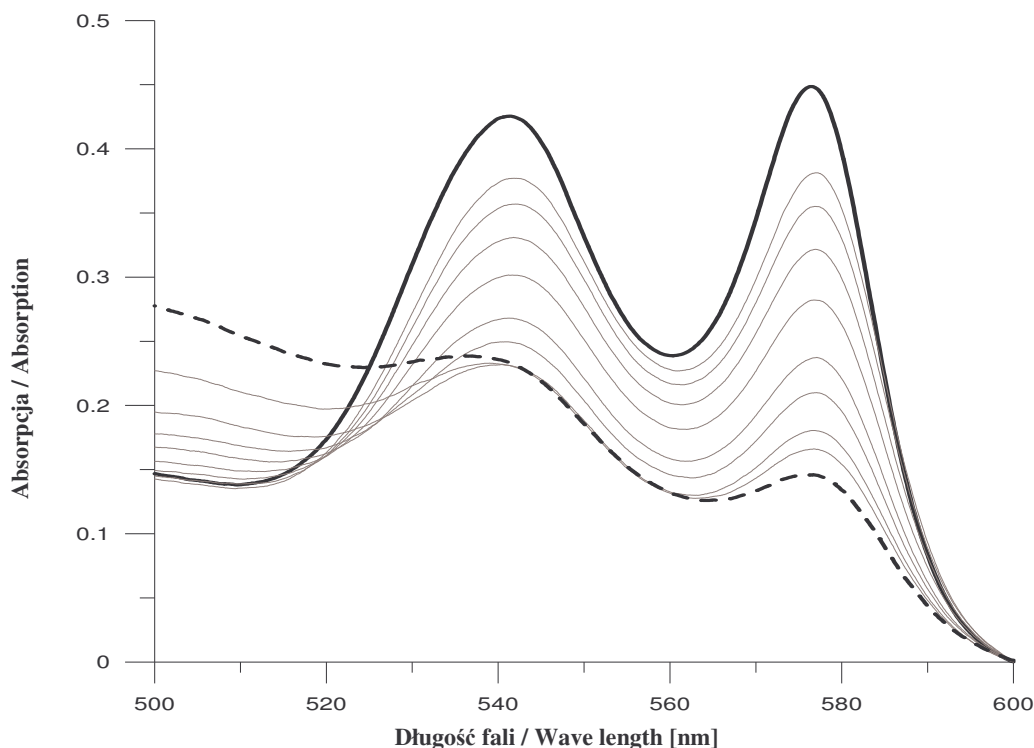
Do interpretacji wyników zastosowano analizę wariancji, a obliczenia wykonano przy użyciu programu Statistica 5.1.

## Wyniki i dyskusja

Przykładowy zapis widm absorpcji roztworu oksyhemoglobiny o pH = 5,6 w temp. 20°C, powyżej 50°C i w temp. denaturacji przedstawiono na rys. 1.

Zanik pików absorpcji w zakresie widma widzialnego obu analizowanych form hemoglobiny był rezultatem ich precypitacji w roztworze po ogrzaniu do określonej temperatury. Według Lawrie'go [13], brak jest jednoznacznej opinii czy można traktować wytrącanie barwników hemowych pod wpływem temperatury jako wskaźnik ich denaturacji cieplnej. Trout [25] uważa, że temperatura w jakiej precypitują barwniki hemowe w mięsie jest temperaturą ich denaturacji cieplnej. Kierując się opinią Trouta [25], precepitację analizowanych form hemoglobiny w roztworze wodnym, po jego podgrzaniu do określonej temperatury, przyjęto w niniejszej pracy jako wskaźnik denaturacji badanych barwników.

Na rys. 2. przedstawiono wyniki pomiaru temperatury denaturacji oksy- i methemoglobiny krwi w zależności od wartości pH wodnego roztworu barwników. Temperatura w jakiej ulegały denaturacji oksyhemoglobina i methemoglobina była zależna od wartości pH. W przypadku oksyhemoglobiny zależność ta była większa szczególnie w niższych wartościach pH. W roztworze o pH 5,0 oksyhemoglobina denaturowała w temp. 57,3°C, w roztworze o pH 5,2 – w 60,3°C, w roztworach o pH w zakresie 5,4–6,6 – w temp. 64–66°C, natomiast w pH = 6,8 oraz w pH = 7,0 – odpowiednio w temp. 67°C i 68°C. Natomiast methemoglobina denaturowała w roztworze o pH = 5,0 w temp. 61,6°C, a w roztworach o pH 5,2–7,0 w zakresie temp. 64–66°C.

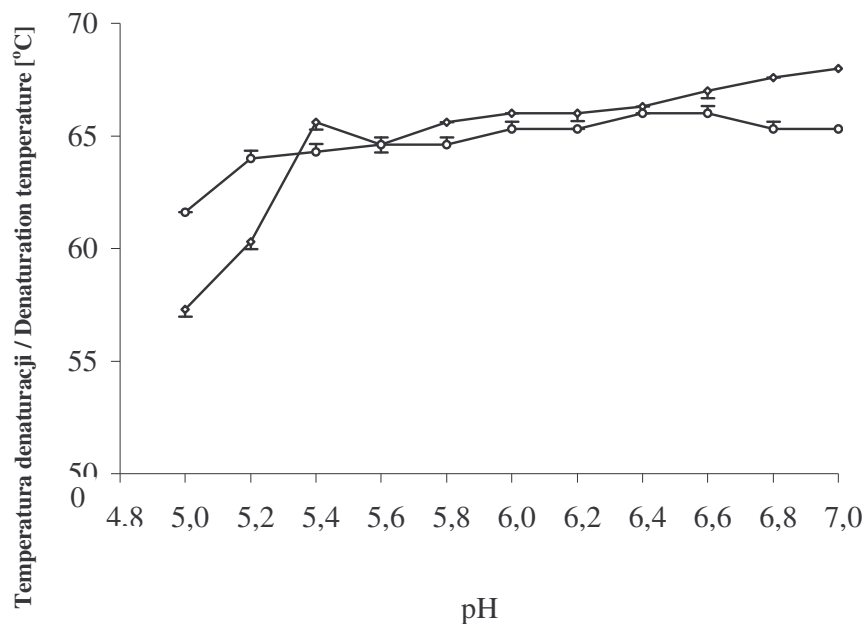


Rys. 1. Przykładowy zapis widm absorpcji roztworu oksyhemoglobiny o pH = 5,6 w temp. 20°C (—), powyżej 50°C (—) i w temp. denaturacji (— —).

Fig. 1. An example of absorbance spectra of a solution of oxyhaemoglobin showing a pH value = 5.6 at  $t = 20^{\circ}\text{C}$  (—),  $t > 50^{\circ}\text{C}$  (—), and at a denaturation temperature (— —).

Stwierdzona niższa temperatura denaturacji analizowanych barwników hemowych krwi, szczególnie oksyhemoglobiny, w bardziej kwaśnym środowisku jest zgodna z wynikami, jakie uzyskano w przypadku mioglobiny, barwnika hemowego mięśni [4, 6, 10, 20, 26]. Większa odporność na temperaturę ogrzewania methemoglobiny, szczególnie w roztworach o niższych wartościach pH, potwierdza opinię, że utlenione formy barwników hemowych są bardziej odporne na ogrzewanie [17].

Na rys. 3. i 4. przedstawiono wyniki obrazujące wpływ stężenia soli kuchennej (NaCl) na temperaturę denaturacji oksyhemoglobiny i methemoglobiny odpowiednio w roztworach o pH = 5,6 i pH = 6,8. Wyniki analizy statystycznej ocenianych zmiennych (forma barwnika, pH roztworu, dodatek soli) na temperaturę denaturacji analizowanych barwników krwi przedstawiono w tab. 1.



Rys. 2. Wpływ pH na temperaturę denaturacji oksyhemoglobiny i methemoglobiny w roztworach wodnych. Zaznaczono wartości średnie i błędy standardowe średniej.

Fig. 2. The effect of pH on the denaturation temperature of oxyhaemoglobin and methaemoglobin in water solutions. Mean values and standard errors of the mean are indicated.

—◇— oksyhemoglobina                      —○— methemoglobina  
 —◇— oxyhaemoglobin                      —○— methaemoglobin

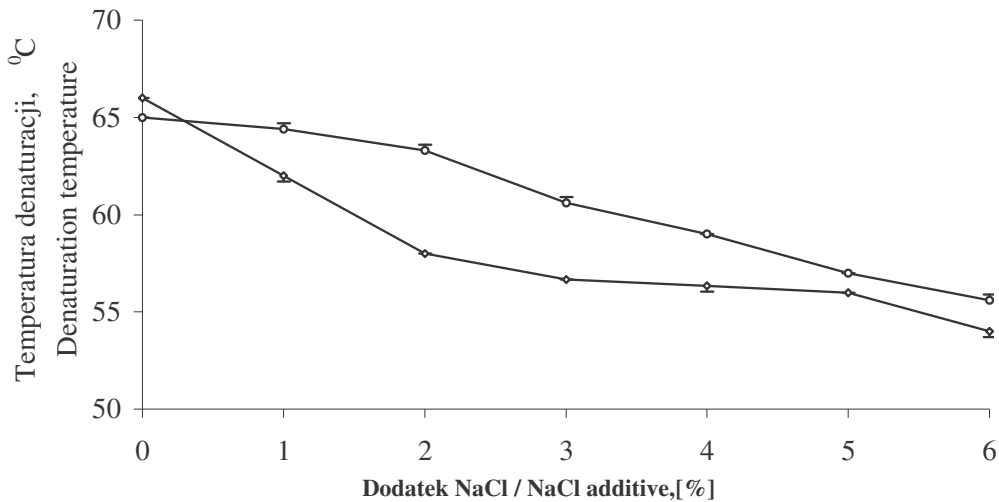
Tabela 1

Średni kwadrat odchyleń z analizy wariancji temperatury denaturacji barwników hemowych krwi w zależności od formy barwnika, wartości pH i dodatku soli.

Mean square analysis of variation of denaturation temperature of blood haem pigments depending on: pigment form, pH value and salt addition.

Rodzaj zmienności Kind of variation	Stopnie swobody Degrees of freedom	Średni kwadrat odchyleń Mean square	F
Forma barwnika - A Pigment form	1	19,05	106,67**
Wartość pH - B pH value	1	466,71	2613,60**
Dodatek soli - C Salt additive	6	76,83	430,72**
Interakcja / Interaction:			
A x B	1	29,76	166,67**
A x C	6	5,27	29,51**
B x C	6	18,55	103,87**
A x B x C	6	1,82	10,18**
Błąd / Error	56	28,05	0,18

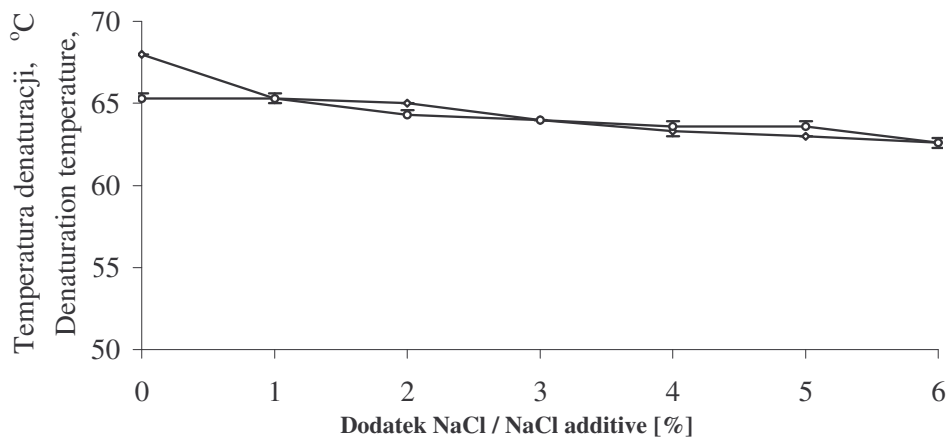
\*\*Wartości F istotne przy  $P < 0,01$ .



Rys. 3. Wpływ stężenia soli na temperaturę denaturacji oksyhemoglobiny i methemoglobiny w roztworach o pH 5,6. Zaznaczono wartości średnie i błędy standardowe średniej.

Fig. 3. The effect of salt concentration on the denaturation temperature of oxyhaemoglobin and methaemoglobin in the solutions of pH = 5.6. Mean values and standard errors of the mean are indicated.

—◇— oksyhemoglobina      —○— methemoglobina  
oxyhaemoglobin      methaemoglobin



Rys. 4. Wpływ stężenia soli na temperaturę denaturacji oksyhemoglobiny i methemoglobiny w roztworach o pH 6,8. Zaznaczono wartości średnie i błędy standardowe średniej.

Fig. 4. The effect of NaCl added on the denaturation temperature of oxyhaemoglobin and methaemoglobin in the solutions at pH = 6.8. Mean values and standard errors of the mean are indicated.

—◇— oksyhemoglobina      —○— methemoglobina  
oxyhaemoglobin      methaemoglobin

Dodatek soli do roztworów obu form hemoglobiny powodował obniżenie temperatury ich denaturacji. Spadek temperatury denaturacji obu barwników był



znacznie większy w roztworach o pH = 5,6 niż w roztworach o pH = 6,8. Temperatura denaturacji obu form hemoglobiny w roztworze o 6% stężeniu NaCl była niższa o około 10°C w porównaniu z temperaturą denaturacji obu barwników w roztworach bez dodatku soli. Inni autorzy stwierdzili, że sól obniża temperaturę denaturacji mioglobiny [1, 2, 10, 14, 20, 25]. Według Murray i wsp. [19], przyczyną obniżenia temperatury denaturacji barwników hemowych w obecności soli jest oddziaływanie jonów chlorkowych na wodę hydratacyjną białek. Jony chlorkowe charakteryzując się dużym powinowactwem do wody, usuwają część wody hydratacyjnej z powierzchni białek, które zlepiając się w większe agregaty, ulegają wysoleniu.

Należy podkreślić, że znaczny spadek temperatury denaturacji barwników hemowych w obecności soli, w roztworach o pH charakterystycznych dla mięsa o prawidłowych właściwościach jakościowych (pH = 5,6), może być ważnym wskaźnikiem dla technologów, że zmiana barwy mięsa solonego poddanego ogrzewaniu nie może być podstawowym kryterium oceny stopnia ugotowania niepeklowanego solonego produktu mięsnego.

### **Wnioski**

1. Zmniejszenie pH wodnych roztworów oksyhemoglobiny i methemoglobiny pochodzących z krwi bydła powoduje obniżenie temperatury ich denaturacji.
2. W roztworach o pH w zakresie 5,4–6,8 barwniki hemowe krwi ulegają denaturacji cieplnej w temperaturze 64–66°C.
3. Dodatek chlorku sodu do wodnych roztworów barwników hemowych krwi obniża temperaturę ich denaturacji cieplnej. Obniżenie tej temperatury w obecności soli jest istotnie większe w pH = 5,6 niż w pH = 6,8.

*Praca została zrealizowana w ramach grantu promotorskiego 6 PO6P 074 21*

### **Literatura**

- [1] Andersen H.J., Bertelsen G., Skibsted L.H.: Salt effect on acid catalysed autooxidation of oxymyoglobin. *Acta Chem. Scand.*, 1988, **42**, 226-236.
- [2] Barbut S., Findlay C. J.: Influence of sodium, potassium and magnesium chloride on thermal properties of beef muscle. *J. Food Sci.*, 1991, **56**, 180-182.
- [3] Brewer M.S., Zhu L.G., Bidner B., Meisinger D.J., McKeith F.K.: Measuring pork color: effects of bloom time, muscle, pH and relationship to instrumental parameters. *Meat Sci.*, 2001, **57**, 169-176.
- [4] Chu Y.H., Huffman D.L., Egbert W.R., Trout G.R.: Color and color stability of frozen restructured beef steaks. Effect of processing under gas atmospheres with differing oxygen concentration. *J. Food Sci.*, 1988, **53**, 705-710.
- [5] Cornforth D.: Color: its basis and importance. In: Pearson A.M., Dutson T.R. - Quality attributes and their measurements in meat, poultry and fish products. *Adv. Meat Research*. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK 1994, pp. 35-78.
- [6] Cornforth D.: Cooked meat color. *Meat Foc. Intern.*, 1996, **5**, 305-306.
- [7] Dąbrowski Z.: Fizjologia krwi. Wybrane zagadnienia. *Wyd. Nauk. PWN*. Warszawa 1998.



- [8] Gašperlin L., Žlender B., Abram V.: Colour of beef heated to different temperatures as related to meat ageing. *Meat Sci.*, 2001, **59**, 23-30.
- [9] Geileskey A., King R.D., Corte D., Pinto P., Ledward D.A.: The kinetics of cooked meat haemoprotein formation in meat and model system. *Meat Sci.*, 1998, **48**, 189-199.
- [10] Gimeno O., Astiasarán I., Bello J.: Calcium ascorbate as a potential partial substitute for NaCl in dry fermented sausages: effect on colour, texture and hygienic quality at different concentrations. *Meat Sci.*, 2001, **57**, 23-29.
- [11] Hutchings J.B.: *Food colour and appearance*. Chapman & Hall. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK 1994.
- [12] Kolb H., Heinz G., Wiegand W. H.: Fleischfarbe. Möglichkeiten der Farbbeeinflussung durch Pökellung sicht. *Ueber. Fleischwirtschaft*, 1990, **70**, 956-960, 965-966, 1050.
- [13] Lawrie R.A.: *Meat Science*. 6<sup>th</sup> ed. Pergamon Press, Oxford, UK 1985.
- [14] Lytras G.N., Geileskey A., King R.D., Ledward D.A.: Effect of muscle type, salt and pH on cooked meat haemoprotein formation in lamb and beef. *Meat Sci.*, 1999, **52**, 189-194.
- [15] MacLean N.: *Haemoglobin*. Bulletin Studies in Biology no. 93. Arnold E. Publishers Ltd., London, UK 1978.
- [16] McLoughlin J.V.: Studies on pig muscle. II. The effect of rapid post-mortem fall on the extraction of sarcoplasmatic and myofibrillar proteins of post-rigor muscle. *Irisch J. Agr. Res.*, 1963, **2**, 115-124.
- [17] Mendenhall V.T.: Effect of pH and total pigment concentration on the internal color of cooked ground beef patties. *J. Food Sci.*, 1989, **54**, 1-2.
- [18] Millar S.J., Moss B. W., Stevenson M. H.: Some observations on the absorption spectra of various myoglobin derivatives found in meat. *Meat Sci.*, 1996, **42**, 277-288.
- [19] Murray R. K., Gartner D.K., Mayes P.A., Rodwel V.W.: *Biochemia Harpera*. PZWL, Warszawa 1995, *rodz.7*, s. 71-74.
- [20] Palka K., Kupiec B., Kołczak T.: Wpływ pH i poziomu barwników hemowych na stopień denaturacji i barwę mięsa podczas ogrzewania. *Zesz. Nauk. AR, Kraków; s. Technologia Żywności*, 1994, z. **6**, 193-200.
- [21] Pezacki W.: *Technologia mięsa*. WNT. Warszawa 1981.
- [22] Potthas K.: Fleischfarbe, Farbstabilität und Umrötung. *Fleischwirt.*, 1981, **32**, 193-200.
- [23] Stryer L.: *Biochemia*. PWN. Warszawa 1997.
- [24] Torley P.J., D'Arcy B.R., Trout G.R.: The effect of ionic strength, polyphosphates type, pH, cooking temperature and preblending on the functional properties of normal and pale, soft, exudative (PSE) pork. *Meat Sci.*, 2000, **55**, 451-462.
- [25] Trout G.R.: Variation in myoglobin denaturation and color of cooked beef, pork and turkey meat as influenced by pH, sodium chloride, sodium triphosphate, and cooking temperature. *J. Food Sci.*, 1989, **54**, 536 – 540.
- [26] Trout G.R.: The rate of metmyoglobin formation in beef, pork, and turkey meat as influenced by pH, sodium chloride, and sodium triphosphate. *Meat Sci.*, 1990, **28**, 203-210.
- [27] Wright D.J., Leach I.B., Wilding P.: Differential scanning calorimetric studies of muscle and its constituent proteins. *J. Sci. Food Agric.*, 1977, **28**, 557-564.

**EFFECT OF pH AND SODIUM CHLORIDE ON THERMAL DENATURATION OF OXY- AND METHAEMOGLOBIN****S u m m a r y**

The objective of this investigation was to determine the effect of pH and sodium chloride added on the thermal denaturation of oxy- and methaemoglobin. An oxyhaemoglobin, obtained from cattle blood, was changed into a methaemoglobin under a process of oxidizing this pigment using a potassium ferricyanide. A denaturation temperature of the two forms of haem pigment was determined in water solutions showing a pH value ranging from 5.0 to 7.0, as well as in solutions of pH = 5.6 and pH = 6.8 with added sodium chloride amounts ranging from 0 to 6%. For the purpose of determining the denaturation temperature absorption spectra of heated pigment solutions were analyzed. When absorption peaks, defined as characteristic for a given pigment form, disappeared, it was an indicator of the pigment's thermal denaturation. A solution's pH value had a significant impact on the denaturation temperature of both the oxy- and methaemoglobin. The denaturation temperature of the two pigment forms rose along with the growing pH value of the solution. However, in the case of oxyhaemoglobin, its denaturation temperature depended more significantly on the solution's pH if compared with the methaemoglobin. As for solutions showing pH equaling from 5.4 to 5.8, the two pigments were denatured at a temperature of 64 to 66°C. When NaCl was added to the solution of pigments, their denaturation temperature decreased; the decrease in the denaturation temperature in the solutions of pH = 5.6 was higher than in solutions of pH = 6.8.

**Key words:** oxyhaemoglobin, methaemoglobin, thermal denaturation, pH, sodium chloride ☒