

## 4-Hexylresorcinol 침지액 농도와 침지시간에 따라 새우의 갈변도 및 4-Hexylresorcinol 잔류량에 미치는 영향

김영현<sup>1</sup> · 김재민<sup>1</sup> · 이진솔<sup>1</sup> · 강성란<sup>2</sup> · 이옥환<sup>1</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 식품생명공학과

<sup>2</sup>(주)에스푸드가디언스

### Effect of 4-Hexylresorcinol Treatment on Melanosis Inhibition and Residual Levels in Korean Shrimp

Young-Hyun Kim<sup>1</sup>, Jae-Min Kim<sup>1</sup>, Jin-Sol Lee<sup>1</sup>, Seong-Ran Gang<sup>2</sup>, and Ok-Hwan Lee<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University

<sup>2</sup>Food Safety Research Institute Analytical Laboratory, S-Food Guardians Co., Ltd.

**ABSTRACT** 4-Hexylresorcinol (4-HR) has been used for prevention of melanosis in shrimp. Recently, 4-HR in EU and other countries was authorized with maximum residue levels of 1~2 mg/kg but remains unauthorized in Korea. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of 4-HR on melanosis inhibition and residual levels in Korean shrimp according to various concentrations and soaking times. We previously reported that the HPLC-FLD method can be used for detection of 4-HR at maximum levels of 1~2 mg/kg in shrimp. Our results show that residual levels of 4-HR in peeled and unpeeled shrimps were in the range of 0.86 to 13.46 mg/kg and 0.02 to 2.33 mg/kg, respectively. In addition, 4-HR treatment at concentrations of 10 and 20 mg/L for 72 h were effective for inhibition of melanosis in peeled shrimp compared with unpeeled shrimp. These results provide basic data for the establishment of guidelines and regulation related to 4-HR.

**Key words:** 4-hexylresorcinol, shrimp, melanosis, residue level

## 서 론

새우와 같은 갑각류는 수확 후 저장 과정에서 polyphenoloxidase(PPO)로 알려진 효소 복합체에 의해 퀴논 페놀의 산화로 'melanosis' 또는 'black spot'이라고 불리는 갈변현상이 일어난다. 이렇게 생성된 색소를 섭취하게 되었을 때 체내에서는 큰 문제가 되지 않지만 외관을 손상시켜 제품의 품질을 떨어뜨리게 된다(1). 갑각류에서 갈변으로 인한 품질의 저하를 예방하기 위하여 갈변을 억제하는 방법에 대해 많은 연구가 이루어져 왔으며, 식품산업에 적용하기 위한 다양한 기술 및 메커니즘이 개발되었다(2-4).

새우에서 갈변현상은 다른 열화과정보다 사후 저장과정에서 더욱 신속하게 일어나기 때문에 수확 후 즉시 전처리 과정을 통해 갈변을 억제시킬 수 있는 방법을 적용할 필요가 있다. PPO는 살아있는 새우에서 경화에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이를 근거하여 사후 갈변의 진행은 외골격을

따라 여러 부위에서 발생한다(5). 냉장새우의 경우 새우의 두흉부에서 갈변반응이 시작되어 꼬리로 확산되며 갈변의 확산 속도는 새우의 종과 효소 활성 수준의 차이에 따라 다른 것으로 확인되었다(6-8).

새우로부터 갈변을 억제하기 위해 일반적으로 아황산염을 사용해 왔다. 하지만 아황산염은 천식환자나 일부 민감한 사람에게 과민반응 등 심각한 장애를 일으킬 수 있다고 보고되면서 건강상의 문제로 사용이 금지되었다. 이러한 이유로 인해 사용이 금지된 아황산염 대신 사용할 수 있는 물질에 대한 연구가 진행되었으며, 대체재로써 현재 4-hexylresorcinol이 사용되고 있다(9,10). 4-Hexylresorcinol은 일반적으로 안전하다고 인정하는 물질(Generally Recognized as Safe; GRAS)로 분류되어 있으며, 중국과 캐나다에서는 1.0 mg/kg 그리고 유럽에서는 2 mg/kg을 최대잔류허용량으로 규정하여 새우 및 갑각류에 식품첨가물로 사용하고 있다(11-14). 하지만 새우에서 효과적으로 갈변을 억제하기 위한 4-hexylresorcinol 처리 방법에 대한 연구는 부족할 실정이다. 새우의 갈변을 억제하기 위하여 상업제제로 4-hexylresorcinol과 염화나트륨으로 구성된 everfresh(Opta Food Ingredients, Bedford, MA, USA; US patent nr 5059438)라는 제품이 판매되고 있으며, 단지 일부 연구에

Received 4 March 2015; Accepted 17 April 2015

Corresponding author: Ok-Hwan Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 200-701, Korea  
E-mail: loh99@kangwon.ac.kr, Phone: +82-33-250-6454

서 brown shrimp(*Penaeus aztecus*)에 0.005%(15), pink shrimp(*Parapenaeus longirostris*)에 0.01%(16), 그리고 tiger shrimp(*Penaeus japonicus*)에 상당히 높은 0.5% 4-hexylresorcinol을 사용하여 변화를 관찰한 것이 전부이다(17). 식품첨가물의 지나친 사용은 첨가물의 과잉섭취와 처리과정 중 추가적 비용을 증가시키는 문제점을 발생시키기 때문에 효율적인 식품첨가물 사용방법이 요구된다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 유통되는 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*) 종을 이용하여 기존 판매되고 있는 상업체제의 4-hexylresorcinol 농도보다 낮은 농도에서 침지시간에 따른 저장 중 품질 변화 및 최대잔류허용량에 근거하여 4-hexylresorcinol의 잔류량을 비교 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

본 실험에서 사용한 새우는 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*) 종으로 노랑진 수산시장에서 생물로 구매하여 실험 전 동일하게 5분 동안 얼음에 처리한 후 실험에 사용하였다. 4-Hexylresorcinol(purity≥98.0%)과 phosphoric acid는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA), potassium dihydrogen phosphate와 sodium chloride는 Junsei Chemical(Tokyo, Japan)에서 구입하였으며, acetonitrile과 water는 HPLC grade(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)를 사용하였다.

### 침지액 제조 및 침지 조건

실험에 사용한 침지액은 3.5% NaCl 용액에 4-hexylresorcinol을 농도에 따라 첨가하여 제조하였으며, 실험에 사용한 새우는 껍질을 제거하지 않은 새우(whole)와 머리 및 등껍질을 제거한 새우(peeled)로 껍질 유무에 따라 실험군을 나누어 침지하였다. 4-Hexylresorcinol을 처리하지 않은 새우와 50 mg/L 4-hexylresorcinol 침지액에 2분 동안 침지한 새우를 대조군으로 사용하여, 4-hexylresorcinol 침지액 농도와 침지시간에 따른 4-hexylresorcinol의 잔류량 및 갈변 정도를 비교하였다. 새우와 침지액의 비율을 1:2(w/v)로 하여 Table 1과 같이 침지 조건에 따라 침지하였으며, 침지한 새우는 침지액에서 꺼내어 얼음을 덮어 7°C에서 10일 동안 저장한 후 갈변이 진행된 정도와 잔류량을 분석하였다.

**Table 1.** Treatment regime for shrimp

Sample	4-Hexylresorcinol concentration (mg/L)	Time
Shrimp (Whole and peeled)	0	0
	50	2 min
	5	
	10	8 h, 24 h, 72 h
	20	

### 잔류량 분석

4-Hexylresorcinol 잔류량을 분석하기 위해 새우의 모든 껍질을 제거하고 믹서(SFM-656CS, Shinil Industrial, Seoul, Korea)를 이용하여 균질화 시킨 후 실험에 사용하였으며, Jonker와 Dekker(18)의 방법을 변형하여 4-hexylresorcinol 함량을 분석하였다. 잔류량을 분석하기 위해서 검체 5 g을 정확히 달아, 증류수 10 mL를 가하여 30초 동안 격렬하게 흔들어 준 뒤 acetonitrile 15 mL를 첨가하여 30초 동안 초음파세척기(JAC 4020, KODO, Seoul, Korea)를 통해 균질화 시킨 후 shaker(SI-600, JEIO TECH, Seoul, Korea)에서 300 rpm으로 15분 동안 추출하였다. 추출물은 원심분리기(FLETA 5, Hanil, Incheon, Korea)를 이용하여 3,000×g에서 3분간 원심분리 하였으며, 상층액을 50 mL volumetric flask에 옮긴 후 남은 침전물을 10 mL acetonitrile을 이용하여 같은 방법으로 2회 반복 추출하고 50 mL로 정용하였다. 추출한 시료는 0.45 µm membrane filter(Millex-HV, Millipore, Bedford, MA, USA)를 통과시킨 후 iLC3300 HPLC system(Labogene, Eresing, Germany)과 fluorescence detector(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 4-hexylresorcinol 잔류량을 분석하였다. 분석용 칼럼은 Phenomenex Gemini 5 µC<sub>18</sub> 110A(5.0 µm, 4.6 mm×250 mm, Torrance, CA, USA), 칼럼 온도는 40°C, 이동상으로는 0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 3.0, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)와 acetonitrile(40:60, v/v)을 이용하여 등용매 조건으로 분석하였으며, 유속은 1.0 mL/min, 주입량은 20 µL로 하여 여기(280 nm) 및 방출파장(310 nm)에서 측정하였다.

### 갈변도 측정

갈변도를 분석하기 위해 digital camera(Optio S1, Pentax Ricoh Imaging, Tokyo, Japan)를 이용하여 침지 후 7°C에서 10일 동안 저장된 새우의 모습을 이미지 파일로 얻었으며(Fig. 1), Adobe Photoshop 7.0 Imaging Software(Adobe, San Jose, CA, USA)를 이용하여 색의 값을 gray scale로 바꾸고 invert 기능을 통해 반전시킨 후 gray value를 측정하였다. 측정하여 얻어진 gray value 값은 아래 식을 이용하여 4-hexylresorcinol을 처리하지 않은 대조군을 기준으로 % relative change로 나타내어 침지 조건에 따른 갈변도를 비교하였다(19).

$$\% \text{ relative change} = \frac{A}{B} \times 100$$

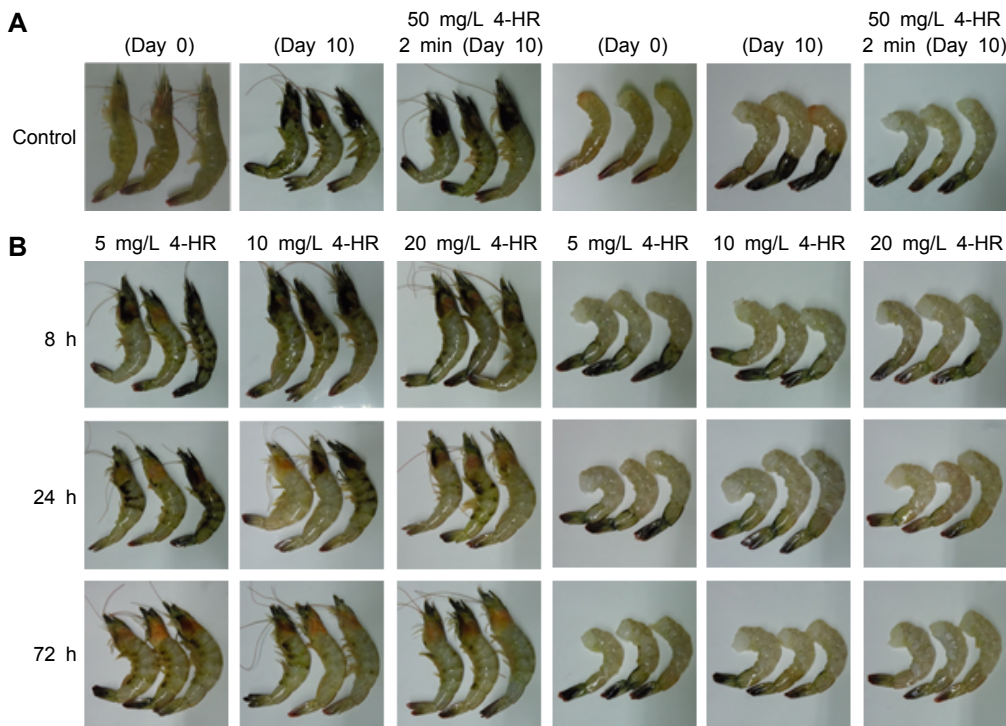
A: 침지 조건에 따른 새우의 gray value

B: 침지 전 새우의 gray value

## 결과 및 고찰

### 침지 조건에 따른 4-hexylresorcinol 잔류량

새우 침지 처리 시 침지액 농도 및 침지시간에 따른 4-



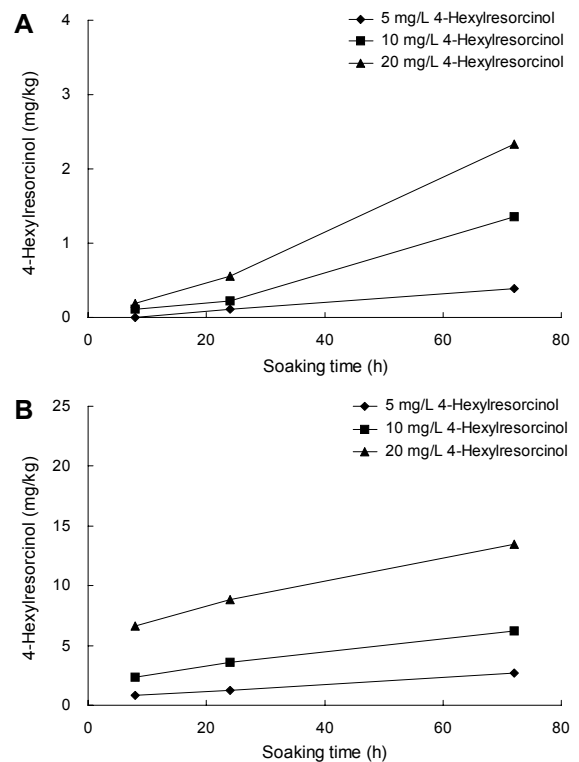
**Fig. 1.** Digital photographs of the development of melanosis according to treatment method of 4-hexylresorcinol (4-HR) in shrimps. Non-treatment shrimp and treatment (20 mg/L 4-HR solution for 2 min) shrimp (A). Change in melanosis during storage at 7°C after 4-HR soaking to various concentration and time (B).

hexylresorcinol의 잔류량을 분석한 결과는 Table 2와 같으며, Fig. 2, 3과 같이 그래프로 나타내어 침지 조건에 따른 잔류량 변화를 비교하였다. 비교를 위해 침지 처리를 하지 않은 새우와 해외에서 사용하는 침지 조건을 이용하여 50 mg/L 농도의 침지액에서 2분 동안 침지한 새우(20)를 대조군으로 설정하였다. 침지액 농도(5, 10, 20 mg/L)와 침지시간(8, 24, 72 h)을 다르게 하여 10일간 7°C에서 저장한 새우와 대조군의 4-hexylresorcinol 잔류량을 분석한 결과, 껍질을 제거하지 않은 새우의 경우 침지하지 않은 새우에서는 4-hexylresorcinol이 검출되지 않은 것을 확인하였으며, 해외에서 사용하고 있는 조건으로 침지한 새우에서는 0.02 mg/kg의 4-hexylresorcinol이 검출되었다. 반면 10 mg/L 농도에서 72시간 침지한 새우에서는 1.36 mg/kg이 검출되

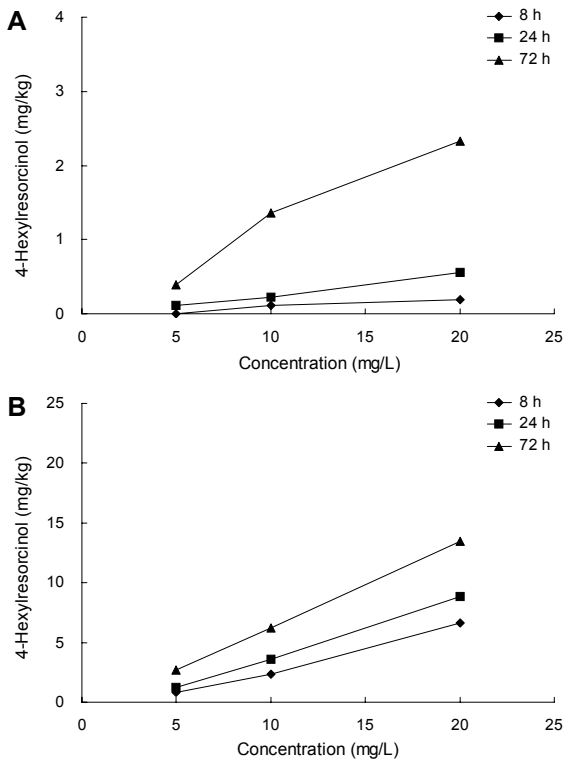
어 중국 및 캐나다의 최대잔류허용량보다 높게 검출되었으며, 20 mg/L 농도에서 72시간 침지한 새우에서는 유럽의 최대잔류허용량을 초과하는 2.33 mg/kg이 검출되었다. 침

**Table 2.** Residual levels according to treatment method of 4-hexylresorcinol in shrimps

Concentration (mg/L)	Soak time	Residual level (mg/kg)	
		Whole shrimp	Peeled shrimp
0	0	Not detected	Not detected
50	2 min	0.02±0.002	0.87±0.002
	8 h	Not detected	0.86±0.006
	24 h	0.11±0.001	1.25±0.003
5	72 h	0.38±0.002	2.67±0.008
	8 h	0.11±0.002	2.33±0.008
	24 h	0.23±0.001	3.59±0.007
10	72 h	1.36±0.003	6.20±0.013
	8 h	0.19±0.001	6.63±0.023
	24 h	0.56±0.001	8.85±0.028
20	72 h	2.33±0.005	13.46±0.016



**Fig. 2.** Residual levels of 4-hexylresorcinol in shrimp according to soaking time. (A) whole and (B) peeled.



**Fig. 3.** Residual levels of 4-hexylresorcinol in shrimp according to concentration of 4-hexylresorcinol. (A) whole and (B) peeled.

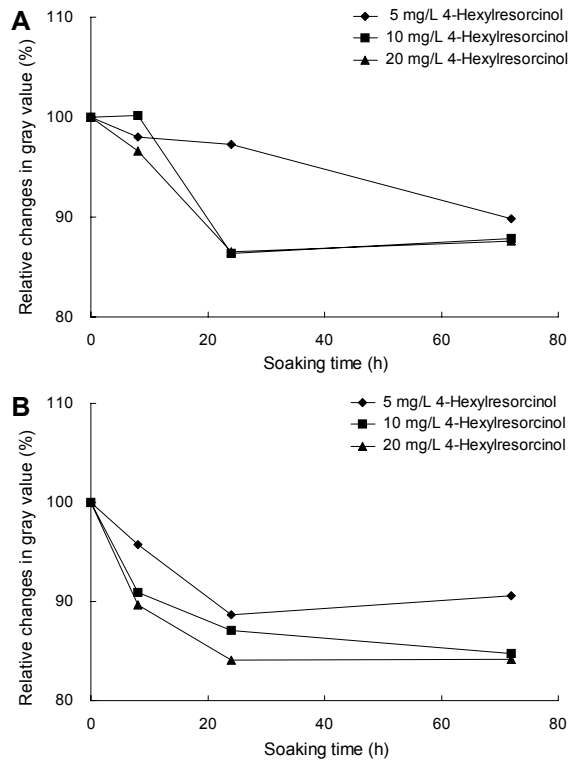
지시간별(Fig. 3) 및 침지액의 농도별(Fig. 4) 농도와 시간에 따른 상관관계( $R^2$ )를 조사한 결과 0.9123~0.9985 범위의 높은 상관관계를 나타내었으며, 농도와 시간에 따라 유의적으로 4-hexylresorcinol 잔류량이 증가하는 것을 확인하였다.

껍질을 제거한 새우에서도 침지하지 않은 새우에서 4-hexylresorcinol이 검출되지 않은 것을 확인하였으며, 해외에서 사용하고 있는 조건으로 침지한 새우에서는 0.87 mg/kg으로 껍질을 제거하지 않은 새우와 비교하여 같은 침지 조건에서보다 높은 잔류량이 확인되었다. 또한 5 mg/L 4-hexylresorcinol 침지액에서 8시간 침지한 조건을 제외하고 모든 조건에서 해외 사용 규정보다 높은 1.25~13.46 mg/kg의 4-hexylresorcinol 잔류량이 검출되었다.

4-Hexylresorcinol을 식품첨가물로 사용하고 있는 중국, 캐나다, 유럽에서 규정하고 있는 최대잔류허용량에 근거하여 10과 20 mg/L 침지액 농도에서 72시간 이상 침지하거나 새우 껍질을 제거하여 침지하는 방법은 최대잔류허용량보다 높은 4-hexylresorcinol이 잔류하게 되기 때문에 침지 방법으로 사용하기에는 어려울 것으로 생각되었다.

**침지 조건에 따른 갈변도 변화**

껍질을 제거하지 않은 새우와 껍질을 제거한 새우의 침지 조건에 따라 갈변도에 미치는 영향을 알아보기 위해 침지 처리한 새우를 10일 동안 7°C에서 저장한 후 변화를 관찰하



**Fig. 4.** Relative changes in the mean gray value of shrimp during storage at 7°C analyzed using Adobe Photoshop 7.0 Imaging Software (Adobe, San Jose, CA, USA). (A) whole and (B) peeled shrimp.

였다. 그 결과 Fig. 1과 같았으며, 껍질을 제거하지 않은 새우에서는 두흉부, 등껍질, 꼬리 부위에서 갈변이 일어나는 것을 확인할 수 있었고 껍질을 제거한 새우에서는 색깔의 변화를 통해 꼬리 부위에서만 갈변이 진행된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Ail 등(21)에 의해 보고된 결과와 유사하였으며, Encarnacion 등(19)의 연구 결과 새우에서 갈변이 일어나는 원인은 새우의 체액에 존재하는 polyphenol-oxidase(PPO)에 의해 갈변이 일어나는 것으로 확인되었다. 갑각류에서 PPO의 활성 시스템은 상처를 입었을 때 기본 면역 반응으로 작용하는 중요한 시스템으로 표피의 경화 또는 회복에 관여한다고 알려져 있다(22,23). Zamorano 등(24)의 연구에서 갈변의 진행과정을 연구한 결과, 아가미를 포함한 두흉부(cephalothorax)에서 처음 갈변이 일어났으며, 등껍질 쪽으로 점차 확장되어 외골격(exoskeleton)으로 갈변이 진행되었다. 새우의 기관을 세부적으로 나누어 분리하여 관찰한 경우 두흉부에서 갈변이 발생한 반면, 분리된 다른 어느 기관에서도 갈변은 일어나지 않았다. 본 연구에서도 두흉부, 등껍질 그리고 꼬리 순서로 갈변이 진행되었으며, 4-hexylresorcinol 침지액에 의해 갈변이 억제될 경우 꼬리, 등껍질 그리고 두흉부 순서로 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

침지 처리 후 10일 동안 7°C에서 저장한 새우를 이미지화 하여 gray value를 측정된 결과 Fig. 4와 같이 침지시간과

침지액의 농도에 따라 갈변 정도가 다른 것을 확인할 수 있었다. 갈변억제 효과는 껍질을 제거하지 않은 새우의 경우 10 mg/L 4-hexylresorcinol과 20 mg/L 4-hexylresorcinol의 침지액에서 24시간 동안 침지한 처리군에서 가장 높은 갈변억제 효과를 나타내었다. 반면 5 mg/L 4-hexylresorcinol 침지액에 침지한 새우는 72시간 동안 침지하였을 때 다른 처리군과 비교하였을 때 갈변이 더 진행되어 있었다. 껍질을 제거한 새우에서는 20 mg/L 4-hexylresorcinol 침지액에서 24시간 동안 침지하였을 때 가장 높은 갈변억제 효과를 나타내었지만 침지시간을 늘려 72시간 동안 침지한 결과, 24시간 동안 침지한 새우와 갈변 정도가 같았다. 또한 10 mg/L 4-hexylresorcinol 침지액에 침지한 새우는 72시간 동안 침지하여야 20 mg/L 4-hexylresorcinol 침지액에서 24시간 동안 침지한 결과와 같은 갈변억제 효과를 나타낼 수 있었다.

## 요 약

껍질을 제거하지 않은 새우의 경우 10일 동안 저장하는 과정에서 갈변이 심각하게 진행된 것을 확인할 수 있었다. 갈변은 두홍부, 등껍질 그리고 꼬리 순서로 진행되었으며, 4-hexylresorcinol 침지액에 의해 갈변이 억제될 경우 꼬리, 등껍질 그리고 두홍부 순서로 억제되었다. 껍질을 제거하지 않은 새우의 경우 10, 20 mg/L 4-hexylresorcinol 침지액 농도에서 72시간 침지한 새우로부터 각각 1.36, 2.33 mg/kg의 잔류농도를 확인하였으며, 해외에서 규정하고 있는 최대잔류수준 이상의 4-hexylresorcinol이 검출되어 갈변억제 효과는 있었지만 사용방법으로 부적합한 것으로 나타났다. 껍질을 제거한 새우의 경우에는 가식부위가 직접 침지액에 침지되기 때문에 대부분의 새우에서 1 mg/kg 이상의 4-hexylresorcinol 잔류량이 확인되었으며, 껍질을 제거한 새우를 20 mg/L 4-hexylresorcinol 침지액에 72시간 동안 침지한 처리군에서 13.46 mg/kg으로 가장 높은 4-hexylresorcinol 잔류량이 확인되었다. 이러한 결과는 캐나다 및 중국뿐만 아니라 유럽에서 규정하고 있는 최대잔류수준을 초과함에 따라서 새우의 침지 조건으로 새우 껍질을 제거한 뒤 침지하는 방법은 적합하지 않은 것으로 판단되며, 갈변억제 효과는 20 mg/L 4-hexylresorcinol 침지액에서 24시간 동안 침지한 처리군에서 가장 높은 억제 효과를 나타내었다. 본 연구 결과 4-hexylresorcinol 침지액 농도와 침지시간에 따라 4-hexylresorcinol 잔류량 및 갈변억제 효과에 높은 상관관계를 나타내었으며, 규정에 제시되어 있는 최대잔류허용량을 초과하지 않고 효율적인 갈변억제 효과를 얻기 위한 방법으로는 껍질을 제거하지 않은 새우에서 20 mg/L 4-hexylresorcinol 침지액에서 24시간 동안 침지 처리하는 방법이 가장 적절한 것으로 확인되었다.

## 감사의 글

본 연구는 2014년도 식품의약품안전처의 연구개발비(14162 MFDS971) 및 2014년도 강원대학교 학술연구조성비(C1010938-01-01)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Manheem K, Benjakul S, Kijroongrojana K, Visessanguan W. 2012. The effect of heating conditions on polyphenol oxidase, proteases and melanosis in pre-cooked Pacific white shrimp during refrigerated storage. *Food Chem* 131: 1370-1375.
2. Encarnacion AB, Fagutao F, Jintasataporn O, Worawattana-mateekul W, Hirono I, Ohshima T. 2012. Application of ergothioneine-rich extract from an edible mushroom *Flammulina velutipes* for melanosis prevention in shrimp, *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei*. *Food Res Int* 45: 232-237.
3. Jeong JW, Park KJ, Sung JM, Kim JH, Kwon KH. 2006. Comparison of quality of peeled lotus roots stored in various immersion liquids during storage. *Korean J Food Sci Technol* 38: 526-533.
4. Whitaker JR. 1993. Principles of enzymology for the food sciences. In *Food Science and Technology*. Marcel Dekker, Inc., CRC Press, New York, NY, USA. Vol 61, p 241-270.
5. Montero P, Avalos A, Perez-Mateos M. 2001. Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition: additives and high-pressure treatment. *Food Chem* 75: 317-324.
6. Simpson BK, Marshall MR, Otwell WS. 1987. Phenoloxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*): Purification and some properties. *J Agric Food Chem* 35: 918-921.
7. Simpson BK, Marshall MR, Otwell WS. 2007. Phenoloxidases from pink and white shrimp: Kinetic and other properties. *J Food Biochem* 12: 205-218.
8. Rolle RS, Guizani N, Chen JS, Marshall MR, Yang JS, Wei CI. 1991. Purification and characterization of phenoloxidase isoforms from taiwanese black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *J Food Biochem* 15: 17-32.
9. Gunnison AF, Jacobsen DW. 1987. Sulfite hypersensitivity. A critical review. *CRC Crit Rev Toxicol* 17: 185-214.
10. Taylor SL, Higley NA, Bush RK. 1986. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *Adv Food Res* 30: 1-76.
11. European Commission (EC). 2011. Commission regulation (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. *Official Journal of the European Union* L295: 1-177.
12. Food and Drug Act. 1998. Regulations Amending the Food and Drug Regulations (1078). *Canada Gazette Part II* 132: 2695-2696.
13. Frankos VH, Schmitt DF, Haws LC, McEvily AJ, Iyengar R, Miller SA, Munro IC, Clydesdale FM, Forbes AL, Sauer RM. 1991. Generally recognized as safe (GRAS) evaluation of 4-hexylresorcinol for use as a processing aid for prevention of melanosis in shrimp. *Regul Toxicol Pharmacol* 14: 202-212.
14. USDA Foreign Agricultural Service. 2011. China-Peoples

- Republic of standards for uses of food additives—Part I . Gain Report No. CH11037, Washington, DC, USA. p 1-123.
15. McEvily AJ, Iyengar R, Otwell S. 1991. Sulfite alternative prevents shrimp melanosis. *Food Technol* 45: 80-86.
  16. Guandalini E, Ioppolo A, Mantovani A, Stacchini P, Giovannini C. 1998. 4-Hexylresorcinol as inhibitor of shrimp melanosis: efficacy and residues studies; evaluation of possible toxic effect in a human intestinal *in vitro* model (Caco-2); preliminary safety assessment. *Food Addit Contam* 15: 171-180.
  17. Montero P, Lopez-Caballero ME, Perez-Mateos M. 2001. The effect of inhibitors and high pressure treatment to prevent melanosis and microbial growth on chilled prawns (*Penaeus japonicus*). *J Food Sci* 66: 1201-1206.
  18. Jonker KM, Dekker CP. 2000. Determination of 4-hexylresorcinol in shrimp by liquid chromatography with fluorescence detection. *J AOAC Int* 83: 241-244.
  19. Encarnacion AB, Fagutao F, Shozen K, Hirono I, Ohshima T. 2011. Biochemical intervention of ergothioneine-rich edible mushroom (*Flammulina velutipes*) extract inhibits melanosis in crab (*Chionoecetes japonicus*). *Food Chem* 127: 1594-1599.
  20. Montero P, Martínez-Álvarez O, Zamorano JP, Alique R, Gómez-Guillén MC. 2006. Melanosis inhibition and 4-hexylresorcinol residual levels in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) following various treatments. *Eur Food Res Technol* 223: 16-21.
  21. Ali M, Gleeson RA, Wei CI, Marshall MR. 1994. Activation mechanisms of pro-phenoloxidase on melanosis development in florida spiny lobster (*Panulirus argus*) cuticle. *J Food Sci* 59: 1024-1030.
  22. Buda ES, Shafer TH. 2005. Expression of a serine proteinase homolog prophenoloxidase-activating factor from the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 140: 521-531.
  23. Martínez-Álvarez O, López-Caballero ME, Montero P, Gómez-Guillén MC. 2005. A 4-hexylresorcinol-based formulation to prevent melanosis and microbial growth in chilled tiger prawns (*Marsupenaeus japonicus*) from aquaculture. *J Food Sci* 70: M415-M422.
  24. Zamorano JP, Martínez-Álvarez O, Montero P, Gómez-Guillén MC. 2009. Characterisation and tissue distribution of polyphenol oxidase of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *Food Chem* 112: 104-111.