

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE VETERINARIE**

Ciclo XXVII

Settore Concorsuale di afferenza: 07/G1

Settore Scientifico disciplinare: AGR/18

**STRATEGIE NUTRIZIONALI FINALIZZATE ALLA MODULAZIONE
DEL MICROBIOTA INTESTINALE DEL CANE E DEL GATTO**

Presentata da: Dott. Carlo Pinna

Coordinatore Dottorato

Prof. Carlo Tamanini

Relatore

Prof. Giacomo Biagi

Esame finale anno 2015

| | |
|--|-----------|
| Riassunto | 5 |
| Abbreviazioni | 9 |
| 1 Introduzione | 10 |
| 2 Il microbiota del cane e del gatto | 11 |
| 2.1 Tecniche di caratterizzazione del microbiota intestinale | 11 |
| 2.1.1 Metodi di coltura tradizionali | 11 |
| 2.1.2 Tecniche molecolari..... | 12 |
| 2.2 Caratterizzazione del microbiota intestinale | 13 |
| 2.3 Contributi funzionali del microbiota intestinale | 17 |
| 3 Fattori nutrizionali e microbiota intestinale | 20 |
| 3.1 Carboidrati e sostanze ad azione prebiotica | 20 |
| 3.1.1 Amido resistente | 21 |
| 3.1.2 Fibra alimentare | 21 |
| 3.1.3 Oligosaccaridi non digeribili..... | 22 |
| 3.2 Effetti delle sostanze prebiotiche sull'ospite..... | 23 |
| 3.2.2 Influenza sulla produzione di acidi grassi volatili | 25 |
| 3.3 Le proteine nell'alimentazione del cane e del gatto..... | 27 |
| 3.4 Le fermentazioni proteiche del microbiota intestinale | 28 |
| 3.4.1 I cataboliti di origine proteolitica | 29 |
| 4 Scopo della ricerca | 33 |
| 5 Impatto di diversi quantitativi di proteina e di alcune sostanze prebiotiche sul microbiota fecale del gatto | 34 |
| 5.1 Materiali e metodi | 34 |
| 5.2 Analisi chimiche e microbiologiche dei campioni | 39 |
| 5.3 Analisi statistica | 40 |
| 5.4 Risultati | 40 |
| 5.5 Discussione..... | 51 |
| 6 Valutazione degli effetti sulla microflora intestinale del cane di diete addizionate di fruttooligosaccaridi e differenti per qualità e quantità della frazione proteica. Impiego di un modello <i>in vitro</i> | 58 |
| 6.1 Materiali e metodi | 58 |
| 6.2 Analisi chimiche e microbiologiche dei campioni | 61 |
| 6.3 Analisi statistica | 61 |
| 6.4 Risultati | 61 |
| 6.5 Discussione..... | 68 |
| 7 Effetti sulla microflora intestinale del cane di diete addizionate di frutto-oligosaccaridi e differenti per qualità e quantità della frazione proteica | 74 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 7.1 | Materiali e metodi | 74 |
| 7.2 | Analisi chimiche e microbiologiche dei campioni | 77 |
| 7.3 | Analisi statistica dei dati | 79 |
| 7.4 | Risultati | 79 |
| 7.5 | Discussione..... | 85 |
| 8 | Valutazione in vitro degli effetti di un estratto a base di tannini e di <i>Yucca schidigera</i> sul microbiota intestinale del gatto | 90 |
| 8.1 | Materiali e metodi | 90 |
| 8.2 | Analisi chimiche e microbiologiche dei campioni | 91 |
| 8.3 | Analisi statistica dei dati | 94 |
| 8.4 | Risultati | 94 |
| 8.5 | Discussione..... | 102 |
| 9 | Effetti di dosi crescenti di lattosio sul benessere intestinale del cane | 109 |
| 9.1 | Materiali e metodi | 109 |
| 9.2 | Analisi chimiche e microbiologiche dei campioni | 110 |
| 9.3 | Analisi statistica | 112 |
| 9.4 | Risultati | 112 |
| 9.5 | Discussione..... | 117 |
| 10 | Conclusioni..... | 121 |
| 11 | Bibliografia..... | 124 |

Riassunto

Il ruolo che il microbiota intestinale riveste nell'impatto sulla salute dell'ospite è stato ampiamente studiato nell'uomo e, negli ultimi anni, negli animali d'affezione. È stato dimostrato come la composizione della dieta possa influenzare lo stato di benessere dell'animale, inducendo rapidi ed importanti cambiamenti all'interno delle popolazioni batteriche che coabitano l'intestino dei mammiferi; attualmente, l'uso di sostanze prebiotiche in nutrizione umana e animale rappresenta una delle strategie maggiormente impiegate e di riconosciuta efficacia per modulare positivamente la composizione ed il metabolismo dell'ecosistema gastroenterico. Il presente progetto di dottorato, articolato in cinque diversi studi, si è proposto di indagare gli effetti sul microbiota intestinale del cane e del gatto di diete a diverso tenore proteico e contenenti proteine di diversa digeribilità in presenza o meno di sostanze prebiotiche. Inoltre, sono stati valutati gli effetti della presenza di un estratto di *Yucca schidigera* e di tannini sulla microflora intestinale del gatto. In ultima istanza, sono state valutate le conseguenze di dosi crescenti di lattosio, disaccaride dai potenziali effetti prebiotici, sul benessere intestinale del cane.

Il primo studio si proponeva di valutare *in vitro* gli effetti sulla composizione ed il metabolismo della microflora fecale del gatto di una dieta a basso tenore proteico e di una dieta ad alto tenore proteico e bassa digeribilità, in combinazione con alcune sostanze prebiotiche. Le feci di 4 gatti adulti sono state utilizzate come inoculo per la fermentazione *in vitro* dei substrati oggetto della prova (GA, GOS, FOS, LAC, CF, PEC) in presenza della dieta a basso contenuto proteico. Il liquido di fermentazione, prelevato a 6 e a 24 h, è stato sottoposto ad analisi chimiche (pH, ammoniaca, AGV, amine biogene) e microbiologiche. Tra tutti i substrati, LAC e FOS hanno mostrato le migliori potenzialità prebiotiche, inducendo un abbassamento del pH, dell'ammoniaca e delle conte di enterobatteriacee, e promuovendo la produzione di butirrato. Successivamente, LAC e FOS sono stati sottoposti a fermentazione in presenza delle due diete ad alto e a basso tenore proteico. Il presente studio ha evidenziato come diete ad elevato titolo proteico formulate con fonti proteiche di scarsa qualità possano determinare effetti negativi sull'ambiente enterico dell'ospite, promuovendo lo sviluppo di popolazioni batteriche sgradite e incrementando la formazione di prodotti microbici del catabolismo proteico. Inoltre, l'efficacia delle sostanze prebiotiche

sembra risultare compromessa in presenza di elevate quantità di proteina indigerita disponibile come substrato energetico per le fermentazioni microbiche.

Scopo della seconda prova è stato quello di verificare *in vitro* gli effetti sul microbiota intestinale del cane di diete a diverso tenore proteico e contenenti proteine a diversa digeribilità in presenza o meno di FOS.

Sei diete estruse sono state impiegate nello studio: 1) dieta di controllo, basso tenore proteico; 2) dieta ad alta proteina e alta digeribilità; 3) dieta ad alta proteina e bassa digeribilità; 4) dieta 1 + FOS; 5) dieta 2 + FOS; 6) dieta 3 + FOS. Le feci di 12 cani adulti sono state utilizzate come inoculo fecale per la fermentazione *in vitro* della frazione indigerita delle diete sperimentali. Dove previsto, i FOS sono stati addizionati in ragione dell'1.5%. Il liquido di fermentazione, prelevato a 6 e a 24 h, è stato sottoposto ad analisi chimiche e microbiologiche.

I valori di pH del liquido di fermentazione sono stati ridotti dalla presenza di FOS e invece aumentati dalle diete più proteiche e meno digeribili. Inoltre, i FOS hanno ridotto le concentrazioni di ammoniaca, aumentando la produzione di putrescina e di AGV e riducendo il rapporto acetato/ propionato. Viceversa, la produzione di AGV è stata ridotta dalle diete meno digeribili. Infine, le diete ad alto tenore proteico hanno determinato una riduzione della presenza di batteri lattici.

I risultati ottenuti nel corso del presente studio hanno dimostrato come l'impiego di FOS nell'alimentazione del cane possa determinare diversi effetti positivi sull'ecosistema intestinale dell'animale, riducendo il pH e le concentrazioni di ammoniaca ed aumentando quelle di AGV. Al contrario, sulla base dei presenti dati, è ipotizzabile che l'impiego di diete ricche di proteine, tanto più se poco digeribili, possa avere conseguenze negative sull'ambiente intestinale, come l'aumento del pH e la proliferazione di batteri indesiderati.

Con il terzo studio ci si è proposti di verificare *in vivo* quanto osservato nella precedente prova. La prova è stata condotta su un gruppo di 12 cani adulti e in buono stato di salute; ciascun animale ha ricevuto a rotazione, secondo uno schema 2x6, ognuna delle 6 diete sperimentali precedentemente impiegate nella seconda prova. Ogni dieta è stata somministrata per un periodo di 28 giorni, intervallato dalla somministrazione della dieta di controllo per 12 giorni. Un campione di feci è stato prelevato nei giorni 0, 21 e 28 dalla somministrazione di ciascuna dieta e destinato alle successive analisi chimiche e microbiologiche.

Inoltre, gli effetti sulla digeribilità apparente dei nutrienti sono stati valutati. I risultati ottenuti hanno mostrato come l'impiego di FOS nell'alimentazione del cane possa determinare un miglioramento della biodisponibilità dei minerali. Tuttavia, la loro presenza non sembra contrastare gli effetti negativi che diete ad alto tenore proteico potrebbero avere sull'ecosistema intestinale dell'animale. Infatti, i presenti dati evidenziano come l'impiego di diete ricche di proteine, tanto più se poco digeribili, possa avere conseguenze negative sull'ambiente intestinale, come una riduzione dell'umidità delle feci e l'aumento delle concentrazioni fecali di ammoniaca.

Obiettivo della quarta prova è stato quello di verificare *in vitro* gli effetti di un estratto di *Yucca schidigera* e di tannini sulla microflora intestinale del gatto. Le feci di 4 gatti adulti sono state utilizzate come inoculo fecale per la fermentazione degli estratti oggetto della prova. Il liquido di fermentazione, prelevato a 6 e a 24 h, è stato sottoposto ad analisi chimiche (pH, ammoniaca, acidi grassi volatili, composti volatili) e microbiologiche. Entrambi i substrati hanno avuto influenza sul metabolismo della microflora intestinale del gatto, andando ad alterare le concentrazioni degli acidi grassi volatili negli inoculi fecali. I tannini, ed in particolar modo la yucca, si sono dimostrati efficaci nel contenere la produzione di sostanze maleodoranti quali l'acido solfidrico; tuttavia, un aumento del *p*-cresolo, catabolita originante dalle fermentazioni proteolitiche e implicato nella patogenesi di alcune patologie del tratto enterico, è stato associato alla presenza di tannini. Nonostante siano necessari ulteriori studi, i risultati ottenuti nel corso della presente sperimentazione hanno mostrato come l'inclusione nella dieta di estratti di *Yucca schidigera* e tannini possa contribuire a mitigare l'emanazione di sostanze maleodoranti dalle deiezioni degli animali da compagnia.

Intento dell'ultima prova è stato quello di verificare gli effetti della somministrazione di lattosio sul benessere intestinale del cane. 14 cani adulti sono stati alimentati con una dieta secca commerciale a cui sono state aggiunte dosi crescenti di lattosio in polvere (0.5, 1.0 e 2.0 g/d per kg^{0.75}) somministrate, ciascuna, per un periodo di 20 giorni. Al termine di ciascun periodo un campione di feci è stato raccolto da ogni animale e destinato alla determinazione del pH, ammoniaca, acidi grassi volatili e delle principali popolazioni microbiologiche. Anche gli effetti sulla digeribilità apparente dei nutrienti sono stati valutati. La

somministrazione di dosaggio crescenti di lattosio ha contribuito a ridurre i parametri indicatori di proteolisi intestinale, quali le concentrazioni fecali di ammoniaca e acido isovalerico. I risultati ottenuti nel presente esperimento potrebbero suggerire come la supplementazione delle diete con lattosio, nonostante sia stata osservata una riduzione delle fermentazioni proteolitiche in intestino, non abbia avuto particolari effetti di tipo prebiotico nei confronti delle popolazioni batteriche prese in esame nei cani partecipanti alla prova. Nonostante le quantità di lattosio assunte dai soggetti in prova fossero tutt'altro che trascurabili, i risultati ottenuti fanno supporre come perfino nel cane la capacità di produrre lattasi possa protrarsi anche in età adulta.

Abbreviazioni

| | |
|---------|--|
| AGV | Acidi grassi volatili |
| CF | Fibra di carota |
| CTRL | Dieta di controllo |
| DGGE | Elettroforesi su gel in gradiente denaturante |
| DNA | Acido desossiribonucleico |
| EM | Energia metabolizzabile |
| FISH | Ibridazione fluorescente <i>in situ</i> |
| FO | Fruttooligosaccaridi |
| GA | Sale sodico dell'acido gluconico |
| GOS | Galattooligosaccaridi |
| HD | Dieta con proteine ad elevata digeribilità |
| HP | Dieta ad alto titolo proteico |
| IBD | Malattie infiammatorie croniche intestinali |
| LAC | Lattulosio |
| LD | Dieta con proteine a bassa digeribilità |
| LP | Dieta a basso titolo proteico |
| MJ | Mega joule |
| MOS | Mannanooligosaccaridi |
| NDO | Oligosaccaridi non digeribili |
| PG | Proteina grezza |
| PCR | Reazione a catena della polimerasi |
| PEC | Pectina da agrumi |
| rRNA | Acido ribonucleico ribosomiale |
| RT-qPCR | PCR quantitativa in tempo reale |
| SS | Sostanza secca |
| SOS | Oligosaccaridi della soia |
| TGGE | Elettroforesi su gel in gradiente di temperatura |
| UFC | Unità formanti colonia |
| XOS | Xilooligosaccaridi |

1 Introduzione

Il ruolo che il microbiota intestinale riveste nell'impatto sulla salute dell'ospite è stato ampiamente studiato nell'uomo e, negli ultimi anni, negli animali d'affezione. È stato dimostrato come la composizione della dieta possa influenzare lo stato di benessere dell'animale, inducendo rapidi ed importanti cambiamenti all'interno delle popolazioni batteriche che coabitano l'intestino dei mammiferi; attualmente, l'uso di sostanze prebiotiche in nutrizione umana rappresenta una delle strategie maggiormente impiegate e di riconosciuta efficacia per modulare positivamente la composizione ed il metabolismo dell'ecosistema gastroenterico.

Il forte legame emotivo tra uomo e animali da compagnia ha sempre avuto un grosso impatto sulla qualità dell'alimentazione di questi ultimi. Gli animali d'affezione non devono fornire le massime produzioni possibili, né tantomeno raggiungere il più alto indice di conversione alimentare; per i proprietari di cani e gatti è invece di fondamentale importanza che il proprio animale viva in salute e il più a lungo possibile.

Cani e gatti soffrono delle tipiche patologie che affliggono il mondo occidentale, quali obesità, tumori, malattie cardiovascolari e patologie renali. In ragione di queste problematiche si è sviluppato un notevole interesse nei confronti dell'impiego di alimenti funzionali nell'alimentazione dei carnivori domestici. Infatti, sebbene cane e gatto siano riconosciuti come animali dalla dieta prevalentemente o strettamente carnivora, alcuni studi dimostrano come l'inclusione nella dieta di alimenti funzionali, in particolar modo di sostanze prebiotiche, sia in grado di esercitare, in rapporto alla loro composizione, una grande influenza sulle condizioni trofico-sanitarie dell'apparato digerente e, conseguentemente, sullo stato di benessere generale dell'animale. Nell'uomo è stato evidenziato come i cataboliti derivanti dalla fermentazione batterica della quota proteica indigerita possano avere effetti negativi sulla salute del tratto enterico. Questo aspetto, ancora poco studiato, desta particolare interesse nell'alimentazione del cane e del gatto, le cui diete sono a volte formulate con fonti proteiche di scarsa qualità e poco digeribili.

2 Il microbiota del cane e del gatto

Cane e gatto sono colonizzati da una complessa comunità di microorganismi i quali rivestono un enorme impatto sulla salute dell'ospite. Diversi distretti corporei come la cute, l'apparato buccale e le vie respiratorie, il tratto urogenitale e il tratto gastroenterico ospitano uno specifico ecosistema microbico, il quale è in simbiosi con l'apparato stesso.

Il tratto gastroenterico dei mammiferi ospita uno dei più ampi e complessi ecosistemi noti che, oltre a numerosissime specie batteriche, alberga anche archeobatteri, funghi, protozoi e virus. È stato stimato come il carico microbico intestinale spazi tra 10^{12} e 10^{14} organismi, comprendente circa 500~1000 specie il cui genoma complessivo sembra contenere circa 100 volte il numero di geni del genoma umano: il microbiota è stato considerato come un organo metabolico perfettamente convertito alla fisiologia dell'ospite, in grado di svolgere funzioni fondamentali che l'ospite stesso non sarebbe in grado di assolvere (Bäckhed et al., 2004).

Alla nascita il tratto gastroenterico è sterile ma, con il passare delle ore, inizia a popolarsi sempre più di numerose specie batteriche provenienti dal canale del parto, dall'ambiente circostante e dal latte materno (Buddington, 2003). Durante le prime settimane di vita predominano le specie aerobiche, mentre nell'intestino dell'animale geriatrico sembrano prevalere le popolazioni anaerobiche (Benno et al., 1992; Buddington, 2003; Koenig et al., 2011). Il microbiota intestinale è destinato a evolvere nel tempo, mostrandosi piuttosto stabile in età adulta (Buddington, 2003), mentre nell'animale geriatrico la popolazione residente appare più semplice e meno diversificata, probabilmente in funzione dei cambiamenti strutturali e funzionali del tratto gastroenterico (Benno et al., 1992; Simpson et al., 2002). Sono state osservate inoltre ampie differenze tra il microbiota del cane e quello del gatto e tra soggetti della stessa specie (Schaible and Kaufmann, 2005).

2.1 Tecniche di caratterizzazione del microbiota intestinale

2.1.1 Metodi di coltura tradizionali

È stato più volte osservato come le tradizionali tecniche di coltura dei microorganismi non forniscano accurate e sufficienti informazioni sulla diversità

delle specie che fanno parte di ecosistemi complessi quali il microbiota intestinale (Greetham et al., 2002; Hooda et al., 2012; Mentula et al., 2005; Simpson et al., 2002), proprio a causa delle caratteristiche intrinseche di queste metodiche. Infatti, a causa della scarsità di informazioni sulle corrette esigenze nutrizionali di numerosissime specie batteriche e della predominanza in intestino di popolazioni strettamente anaerobiche, meno del 5% del microbiota intestinale può essere coltivato, mentre una frazione ancora più piccola può essere identificata e classificata correttamente (Suchodolski, 2011).

2.1.2 Tecniche molecolari

A causa degli evidenti limiti dei tradizionali metodi di coltura, le tecniche di biologia molecolare sono diventate il nuovo standard nello studio del microbiota intestinale. Numerosi “*molecular tools*” atti a studiare la filogenesi e identificare i batteri utilizzano come “marker molecolare” il gene 16S rRNA, la cui caratteristica peculiare risiede nella presenza di regioni a diverso grado di conservazione, ossia:

- regioni conservate universali, che possiedono la stessa sequenza in tutti i batteri;
- regioni semiconservate, possiedono sequenza identica tra batteri dello stesso taxon;
- regioni variabili, in cui batteri della stessa specie possiedono la medesima sequenza.

Il rapporto tra regioni conservate e variabili permette di discriminare tra le differenti specie batteriche, identificarle e assegnarle correttamente a un determinato gruppo filogenetico (Sekirov et al., 2010).

Tra i *molecular tools* che sfruttano le caratteristiche intrinseche del gene 16S rRNA ricordiamo la real time PCR (RT-qPCR), l’ibridazione fluorescente *in situ* (FISH), l’elettroforesi su gel in gradiente denaturante (DGGE) e di temperature (TGGE), il pirosequenziamento 454 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA), il sequenziamento Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) e il metodo Sanger. Le tecniche di sequenziamento cosiddette “next-generation” (454 pyrosequencing, Illumina) sfruttano il metodo *shotgun*, il quale si basa sul clonaggio di frammenti multipli di piccole dimensioni per poi ricostruire la sequenza di contigui definitiva. Anche le metodiche molecolari soffrono di alcune limitazioni. Le tecniche di campionamento, l’uso di differenti metodiche di estrazione del DNA e l’utilizzo di diversi primers per PCR (Middelbos et al., 2010; Smith et al., 2011; Suchodolski et

al., 2009) o sonde per ibridazione fluorescente *in situ* (Harmsen et al., 2000) possono aumentare la discrepanza tra risultati in studi diversi (Desai et al., 2009; Ritchie et al., 2010). Un recente lavoro sulla comparazione di alcune metodiche di estrazione del DNA da feci ha evidenziato come i metodi di distruzione meccanica delle cellule batteriche siano più efficienti in termini di resa rispetto ai procedimenti che prevedono la sola lisi enzimatica poiché riescono a lisare un numero maggiore di cellule (Salonen et al., 2010).

Inoltre, è noto come alcuni primers comunemente utilizzati sottostimino la presenza di alcuni gruppi batterici, in particolare quelli con un alto contenuto in guanina-citosina (Ritchie et al., 2010; Suchodolski et al., 2008a). Proprio a causa dell'enorme complessità del microbiota intestinale ancora non è ancora stato possibile ottimizzare un protocollo universale di estrazione del DNA batterico, così come non esiste una precisa e accurata metodica che consenta di identificare tutti i microorganismi che albergano nel tratto gastroenterico (Suchodolski, 2011).

2.2 Caratterizzazione del microbiota intestinale

I primi studi volti a caratterizzare le popolazioni residenti nel tratto gastroenterico del cane e del gatto, condotti esclusivamente mediante approcci coltura-dipendenti, hanno permesso di stimare il carico microbico totale dei vari compartimenti enterici. Nello stomaco è presente una concentrazione di microorganismi variabile tra 10^1 e 10^6 UFC/mL di contenuto gastrico (Benno et al., 1992), concentrazione che aumenta procedendo in senso cranio-caudale lungo il tratto gastroenterico e in contemporanea al calo del potenziale ossido-riduttivo. Nel duodeno del cane sono state rilevate concentrazioni comprese tra 10^3 e 10^9 UFC/mL; il gatto sembra invece ospitare una popolazione microbica più densa (10^5 - 10^8 UFC/mL) e prevalentemente anaerobica, al contrario di quanto presente nel cane (German et al., 2003; Johnston et al., 1993). Mentre nel contenuto ileale sono state osservate concentrazioni batteriche pari a quelle già rilevate nel duodeno, la ridotta motilità del grosso intestino, il minor flusso di materiale rispetto al tenue e l'innalzamento del pH indotto da secrezione di bicarbonati fanno sì che il colon risulti l'ambiente maggiormente popolato, con valori pari a 10^9 - 10^{11} UFC/mL.

Grazie alle ultime tecniche di biologia molecolare è stato possibile identificare in campioni fecali di cane e gatto centinaia di filotipi precedentemente sconosciuti

(Handl et al., 2011).

Nel cane, *Helicobacter* spp. e *Lactobacillus* spp. risultano i generi più rappresentativi del microbiota dello stomaco, mentre il phylum Proteobacteria rappresenta la quasi totalità dell'ecosistema gastrico, con oltre il 99,6% delle sequenze identificate (Garcia-Mazcorro et al., 2012).

Attraverso il metodo Sanger, Suchodolski et al. (2008a) hanno identificato nel colon del cane adulto quattro principali phyla: Firmicutes (47.7% delle sequenze), Proteobacteria (23.3%), Fusobacteria (16.6%), Bacteroidetes (12.4%). Lo stesso studio ha messo in evidenza come i compartimenti del tratto intestinale siano caratterizzati da rapporti diversi tra ordini; in particolare i Clostridiales predominano nel duodeno (40% delle sequenze) e nel digiuno (39%), rimanendo comunque piuttosto rappresentativi anche nell'ileo (25%) e nel colon (26%), mentre Fusobacteriales e Bacteroidales prevalgono in ileo (33%) e colon (30%). La famiglia delle Enterobacteriaceae sembra essere più diffusa nella porzione dell'intestino tenue rispetto al colon, mentre la presenza di Lactobacillales è stata accertata lungo tutto il tratto enterico. Secondo Xenoulis et al. (2008), sei phyla sono stati identificati nel duodeno di cani sani: Firmicutes (47% delle sequenze), Proteobacteria (27%), Bacteroidetes (11%), Spirochaetes (10%), Fusobacteria (4%) e Actinobacteria (1%). Più recentemente, Middelbos et al. (2010) hanno caratterizzato filogeneticamente il microbiota fecale del cane mediante pirosequenziamento 454: Fusobacteria (23-40% delle sequenze lette), Firmicutes (14-28%), Bacteroidetes (31-34%), Actinobacteria (0.8-1.4%) e Proteobacteria (5-7%). In seguito, mediante sequenziamento shotgun, Swanson et al. (2011) hanno indagato sul microbiota degli stessi campioni fecali del precedente lavoro di Middelbos et al. (2010), ottenendo risultati parzialmente discordanti: i phyla predominanti sono risultati essere Bacteroidetes (37-38%), Firmicutes (31-35%), Proteobacteria (13-15%), Fusobacteria (7-9%) e Actinobacteria (1%). Oltre alla caratterizzazione dei phyla batterici, che rappresentano nel complesso il 98% delle sequenze individuate, è stata determinata anche la presenza di altri microorganismi quali eucarioti (0.4%), archea (1%) e virus (0.3-0.4%). La discrepanza tra risultati ottenuti, benché derivanti dall'analisi degli stessi campioni, è stata attribuita da Swanson et al. (2011) alla diversa metodica utilizzata e alla differente interpretazione dei risultati.

Nonostante il microbiota intestinale sia uno dei più complessi ecosistemi esistenti, cane e gatto presentano una bassa variabilità a livello filogenetico: sette generi batterici (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Enterobacteriaceae* e *Coriobacterium*) in cinque phyla predominanti (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Actinobacteria*) tra i 70 ad oggi conosciuti (Marchesi, 2010) sono stati identificati nel tratto gastroenterico degli animali d'affezione (Deng e Swanson, 2014). A dispetto di questa bassa variabilità a livello filogenetico, una vastissima mutabilità ai più bassi livelli tassonomici è stata descritta tra le due specie e tra soggetti della stessa specie. Infatti, grazie alle ultime tecniche di identificazione molecolare (Simpson et al., 2002; Suchodolski et al., 2005) è stato accertato come ogni soggetto possieda un proprio microbiota esclusivo, la cui specificità è stata attribuita a caratteristiche intrinseche all'ospite (specie, razza, età, alimentazione), all'ambiente circostante e alle diverse metodologie utilizzate per identificare e quantificare il microbiota (Suchodolski, 2011). Secondo un recente studio di Handl et al. (2011), il gatto sembra mostrare, rispetto al cane, una maggiore complessità del microbiota, dato l'alto numero di generi e specie batteriche identificati, ma una minore variabilità tra individui. È infatti presumibile come la maggiore variabilità interindividuale del microbioma canino sia una diretta conseguenza dell'adattamento del microbiota ad una dieta onnivora e quindi più complessa rispetto alla dieta strettamente carnivora dei felidi, che mostrano una maggiore propensione a condividere gli stessi generi batterici.

Mediante l'analisi del gene 16S rRNA, Ritchie et al. (2008) hanno descritto la vastità della comunità microbica intestinale del gatto, riportando i 5 phyla più significativi: *Firmicutes* (68%), *Proteobacteria* (14%), *Bacteroidetes* (10%), *Fusobacteria* (5%) e *Actinobacteria* (4%). La maggior parte delle sequenze identificate ricade nell'ordine *Clostridiales* (54%), seguiti da *Lactobacillales* nel digiuno e *Bacteroidales* in ileo e colon. Similmente, mediante pirosequenziamento Garcia-Mazcorro et al. (2011) hanno identificato *Firmicutes* (92-95%) e *Actinobacteria* (4-7%) come i phyla predominanti del microbiota fecale. Recentemente, anche Barry et al. (2012) hanno caratterizzato filogeneticamente la comunità microbica fecale del gatto, riportando però proporzioni diverse tra phyla. Nel dettaglio, *Firmicutes* è risultato meno abbondante, pur rimanendo il phylum più rappresentativo (36-50% delle frequenze identificate), così come sono state

identificate un numero maggiore di frequenze attribuibili a Bacteroidetes (24-36%) e Proteobacteria (11-12%). Un'indagine ai più bassi livelli tassonomici è stata condotta da Inness et al. (2007), i quali hanno identificato nelle feci di gatti sani la presenza di *Bacteroides* spp., *Desulfovibrio* spp., *Clostridium histolyticum*, bifidobatteri, lattobacilli ed enterococchi.

Secondo quanto riportato dai più recenti studi, il phylum Firmicutes appare essere il più rappresentativo del microbiota canino e felino. Questo phylum è rappresentato principalmente dall'ordine Clostridiales, il quale è suddiviso in relativi gruppi clostridiali. I cluster XIVa e IV rappresentano circa il 60% di tutti i Clostridiales (Ritchie et al., 2008; Suchodolski et al., 2008a) e includono alcuni generi batterici identificati come produttori di acidi grassi volatili, quali ad esempio *Ruminococcus* spp., *Faecalibacterium* spp., *Dorea* spp. e *Turicibacter* spp. (Suchodolski, 2011). È stato osservato come questi gruppi batterici siano scarsamente rappresentati nel microbiota intestinale di soggetti che soffrono di enteropatie acute o croniche, a sottolineare l'importanza di alcuni microorganismi nel mantenimento dello stato di salute dell'ospite (Sokol et al., 2008; Xenoulis et al., 2008).

La conoscenza della diversità del microbiota intestinale non è sufficiente per una corretta interpretazione dell'interazione ospite-microbiota: grazie alle nuove metodiche di sequenziamento del DNA o rRNA, oltre alla caratterizzazione tassonomica dei microorganismi, è infatti possibile ottenere informazioni sul microbioma e, conseguentemente, sui suoi aspetti funzionali (Gill et al., 2006). Nel cane, l'analisi metagenomica del microbioma intestinale (Swanson et al., 2011) ha permesso di identificare la percentuale di genoma codificante per le diverse funzioni metaboliche, quali trasporto e metabolismo dei carboidrati (12-13% delle sequenze), metabolismo proteico (8-9%), metabolismo del DNA (7%), biosintesi della capsula e della parete cellulare (7-8%), aminoacidi e derivati (7%), virulenza (6-7%) e produzione di cofattori, vitamine e pigmenti (6%). Analogamente al lavoro di Swanson et al. (2011), anche la capacità funzionale del microbioma fecale del gatto è stata descritta, suggerendo come, nonostante sia un carnivoro stretto, il genoma del microbiota intestinale del gatto sia relativamente simile a quello degli onnivori (Barry et al., 2012). Le principali categorie funzionali identificate sono: metabolismo dei carboidrati (15% delle sequenze), metabolismo proteico (8%), aminoacidi e derivati (8%), biosintesi della capsula e della parete cellulare (7%),

metabolismo del DNA (7%), virulenza (6%) e produzione di cofattori, vitamine e pigmenti (6%).

Gli studi riguardanti la presenza di Eucarioti nell'intestino degli animali d'affezione sono piuttosto scarni e poco si conosce sulle caratteristiche di questa porzione di microbiota, che in due analisi metagenomiche condotte sul cane (Swanson et al., 2011) e sul gatto (Barry et al., 2012), non rappresentano rispettivamente più dello 0.01% e 0.31% delle sequenze ottenute del microbiota fecale totale. La diversità della comunità fungina presenti nelle feci è stata descritta da Foster et al. (2013), i quali hanno recentemente identificato nel cane 5 phyla fungini, di cui Ascomycota (98% delle sequenze) e Basidiomycota sono risultati essere i phyla più rappresentativi, mentre un totale di 219 generi sono stati identificati nei 19 animali oggetto dello studio, di cui *Candida* è apparso essere il più abbondante. Sempre nel cane, analoghi risultati sono stati osservati da Swanson et al. (2011) mediante sequenziamento shotgun su campioni fecali e da Suchodolski et al. (2008b) attraverso l'analisi qPCR di campioni prelevati dal duodeno.

Gli Archaea, esseri viventi classificati distintamente da eucarioti e batteri e costituenti un dominio a se stante, sono organismi procarioti anaerobi obbligati. L'analisi delle sequenze del gene 16S rRNA ottenute da campioni di feci di cane e gatto ha permesso di identificare i phyla Crenarchaeota e Euryarchaeota (Suchodolski, 2011; Swanson et al., 2011), anche se le proporzioni di ciascun phylum rimangono ancora sconosciute.

Secondo quanto riportato dai più recenti studi, risulta evidente come ai più alti livelli tassonomici il microbiota intestinale del cane e del gatto risulti simile a quello dell'uomo e del topo, dove in entrambe le specie predominano i phyla Firmicutes e Bacteroidetes. Tuttavia, la principale differenza osservata risiede nell'abbondanza del phylum Fusobacteria, il quale spesso costituisce oltre il 10% delle sequenze identificate nel cane e nel gatto, mentre risulta scarsamente rappresentato nel microbiota umano (Deng e Swanson, 2014).

2.3 Contributi funzionali del microbiota intestinale

La stretta relazione simbiotica tra microorganismi del tratto gastroenterico e ospite contribuisce al mantenimento della salute generale dell'ospite, in virtù di alcuni importanti meccanismi. Il microbiota costituisce parte della barriera

intestinale, una struttura atta a difendere l'ospite dall'invasione dei patogeni. Il meccanismo di difesa si basa sull'instaurarsi di una competizione diretta tra microorganismi, attraverso la sottrazione di nutrienti, l'occupazione preventiva dei siti di adesione a livello di mucosa e la produzione di sostanze ad azione antimicrobica (Liévin-Le Moal e Servin, 2006). Al microbiota intestinale sono state attribuite anche altre funzioni: i) detossificazione di tossici introdotti con la dieta o neoformati in seguito all'attività metabolica dell'ospite o dei microorganismi stessi (Louis et al., 2014; Tomomatsu, 1994); ii) sottrazione di ammoniaca e amine, destinate alla sintesi proteica batterica, con conseguente riduzione dell'assorbimento intestinale degli stessi (Howard et al., 2000); iii) impatto sullo sviluppo immunologico dell'ospite, attraverso la complessa interazione tra batteri non patogeni, epitelio e cellule immuni della mucosa (Cerf-Bensussan e Gaboriau-Routhiau, 2010; Round e Mazmanian, 2009); iv) influenza sull'assorbimento di minerali e sulla sintesi delle vitamine K, piridossina, cobalamina, acido pantotenico, niacina, biotina e folati (de LeBlanc et al., 2010; Kau et al., 2011).

La diversità genica esistente nel microbiota intestinale garantisce la presenza di numerosi enzimi e pathway biochimici diversi da quelli costitutivi dei mammiferi e consente il riutilizzo dei nutrienti assunti con la dieta e che giungono indigeriti nel grosso intestino, con conseguente produzione di un'ampia varietà di cataboliti che rispecchiano la natura del substrato di partenza e le caratteristiche metaboliche della microflora residente (Scott et al., 2013). Tra i principali prodotti della fermentazione rivestono particolare interesse gli acidi grassi volatili, i quali possono costituire un'importante fonte energetica per l'ospite. Rispetto all'uomo e ad altre specie di interesse zootecnico, cane e gatto si sono evoluti come specie carnivore sviluppando un tratto gastroenterico relativamente semplice e, a differenze delle specie erbivore, non dipendono dal microbiota intestinale per soddisfare il proprio fabbisogno energetico (Deng e Swanson, 2014). Nonostante ciò, è stato osservato come le fermentazioni batteriche possano coprire una quota compresa tra il 2 e il 7% del fabbisogno in energia di mantenimento di un cane adulto (Herschel et al., 1981; Stevens e Hume, 1998). Nel dettaglio, gli acidi grassi volatili sono utilizzati come substrato energetico dagli epatociti (propionato e lattato), dai tessuti periferici, nella lipogenesi e nella sintesi del colesterolo (acetato; Cummings e Englyst, 1987; Montagne et al., 2003; Salonen e de Vos,

2014). L'acido butirrico, oltre a fungere da fonte energetica per i colonociti, è coinvolto anche nella regolazione della proliferazione e differenziazione delle cellule, possiede proprietà antiinfiammatorie e sembra implicato anche nella riduzione del rischio di tumore al colon (Ferrarelli, 2015; Williams et al., 2003). Una carenza di butirrato sembra contribuire all'insorgenza di coliti ulcerative e altre condizioni flogistiche in intestino, fenomeni correlati alla penuria di energia per i colonociti (Machiels et al., 2014). Inoltre, l'acido butirrico è risultato più efficace rispetto ad acetato e propionato nell'aumentare l'assorbimento del sodio a livello di mucosa, meccanismo grazie al quale l'organismo è in grado di limitare le perdite di fluidi in seguito a episodi acuti di diarrea (Pieroni e Bass, 2011; Roediger e Moore, 1981). Agli acidi grassi volatili sono state attribuite anche proprietà antibatteriche (Knarreborg et al., 2002), grazie alla riduzione del pH del lume intestinale che, oltre a favorire lo sviluppo di alcune specie microbiche considerate virtuose, induce uno shift da ammoniaca a ione ammonio, prevenendone così l'assorbimento a livello di mucosa (McQuaid, 2005).

3 Fattori nutrizionali e microbiota intestinale

La composizione ed il metabolismo del microbiota intestinale sono fortemente influenzati da una serie di fattori, quali la genetica e lo stato immunitario dell'ospite, l'assunzione di antibiotici (Flint et al., 2012; Relman, 2012) e la composizione della dieta (Duncan et al., 2007; Russell et al., 2011; Walker et al., 2011).

La dieta in particolare riveste un ruolo fondamentale nel modellare l'ambiente enterico: qualità e quantità dei macronutrienti (carboidrati, proteine e lipidi), contenuto e provenienza delle fonti di fibra e l'inclusione di alimenti cosiddetti "funzionali" (prebiotici o probiotici, antiossidanti, acidi grassi *n-3*) possono modulare significativamente il microbiota intestinale (Deng e Swanson, 2014).

3.1 Carboidrati e sostanze ad azione prebiotica

Il principale substrato delle fermentazioni batteriche è rappresentato da carboidrati non digeribili che raggiungono il colon, quali polisaccaridi di struttura, amido resistente e alcuni oligosaccaridi non digeribili (Flint et al., 2012). La disponibilità di carboidrati non digeribili nel grosso intestino è strettamente correlata al tipo di dieta e alla distanza tra un pasto e l'altro. Le diete commerciali destinate all'alimentazione degli animali da compagnia differiscono per la composizione in macronutrienti: gli alimenti secchi estrusi contengono elevate quantità di amido (dal 30 al 60% della sostanza secca), mentre le diete umide, più simili ad una dieta di tipo "ancestrale", sono caratterizzate da un basso contenuto in amido (<10% della sostanza secca) e un alto contenuto in proteine e grassi (Hill et al., 2009; Kerr et al., 2013, 2012). È stato osservato come, a concentrazioni appropriate, i carboidrati non digeribili possano esercitare effetti positivi sulla salute dell'ospite, promuovendo la peristalsi intestinale e riducendo il rischio di costipazione (Leib, 2000; Strompfová et al., 2013; Tortola et al., 2009), aiutando a controllare il peso corporeo, prevenendo le forme diabetiche (Respondek et al., 2008; Rivellesse et al., 1980), migliorando la qualità delle feci, alterando l'ecosistema microbico intestinale e la concentrazione di cataboliti esitanti dalle fermentazioni batteriche (Scott et al., 2008). L'inclusione nella dieta di fonti di fibra dietetica e di sostanze ad azione prebiotica rientra attualmente tra le strategie

alimentari maggiormente impiegate e documentate per modulare il microbiota intestinale del cane e del gatto (Hooda et al., 2012).

3.1.1 Amido resistente

Nell'uomo, l'amido resistente è stato definito come quella frazione di amido che resiste all'azione delle amilasi e non viene idrolizzato in glucosio entro 120 minuti di permanenza in intestino tenue. Ciò è determinato da alcuni fattori intrinseci quali la materia prima di origine, la struttura e la conformazione dei granuli di amido, ma anche dai trattamenti termici a cui vengono sottoposte le materie prime (Fuentes-Zaragoza et al., 2011). Le svariate tipologie di amido resistente che raggiungono il colon influenzano in diverso modo le popolazioni batteriche intestinali (Martínez et al., 2010), la cui capacità di utilizzare tale substrato è condizionata dalle proporzioni di amilosio e amilopectina che compongono la catena polisaccaridica (Ramsay et al., 2006; Ze et al., 2012). Tra le fonti di amido resistente che più comunemente vengono impiegate nella formulazione degli alimenti per animali da compagnia ricordiamo la patata, il riso, il mais, l'orzo e il frumento, oltre ad alcuni legumi (Case et al., 2011).

3.1.2 Fibra alimentare

Il termine fibra alimentare è stato coniato per la prima volta da Hipsley (1953), a indicare i costituenti indigeribili della parete cellulare delle piante, intesi come cellulosa, emicellulosa e lignina. In realtà, già uno studio del 1929 suddivideva i carboidrati in disponibili e non disponibili per l'organismo umano, indicando come disponibili l'amido e gli zuccheri solubili, come indisponibili le emicellulose e le "fibre" (McCance e Lawrence, 1929, citato da Cummings e Stephen, 2007). Nel 1972 Trowell descrisse la fibra alimentare come il residuo della parete delle cellule vegetali all'azione degli enzimi digestivi dell'uomo, supponendo una relazione tra consumo di fibre nella dieta e alcune patologie che caratterizzavano il mondo occidentale (Trowell, 1972). Lo stesso autore negli anni seguenti completò la definizione di fibra alimentare aggiungendo al precedente concetto tutti i polisaccaridi indigeribili quali gomme, mucillagini, cellulosa modificata, oligosaccaridi e pectine (Trowell et al., 1976). Questa definizione, basata su concetti puramente fisiologici, non esclude quelle componenti che non necessariamente si trovano nella parete cellulare (Painter e Burkitt, 1971). La

“American Association of Cereal Chemists” ha definito la fibra alimentare come “la parte edibile dei vegetali o analoghi carboidrati che sono resistenti alla digestione e all’assorbimento nell’intestino tenue dell’uomo ma che sono parzialmente o completamente fermentescibili nel grosso intestino” (Rodríguez et al., 2006). Le fibre alimentari sono note per influenzare il tempo di transito delle *digesta*, mentre gli effetti che potrebbero esercitare sul microbiota intestinale sono ancora controversi (Scott et al., 2013)

3.1.3 Oligosaccaridi non digeribili

Delzenne e Roberfroid (1994) hanno definito gli oligosaccaridi non digeribili (NDO) come carboidrati con grado di polimerizzazione compreso fra tre e nove unità di monosaccaridi che passano indenni il piccolo intestino. Questa caratteristica, unita alla solubilità in acqua, fanno degli NDO un eccellente substrato di crescita per le popolazioni batteriche del colon, dove essi agiscono da prebiotici (Gibson and Roberfroid, 1995; Gibson et al., 1995). Secondo la definizione proposta da Roberfroid (2007) un prebiotico è un ingrediente che è fermentato selettivamente e che induce specifici cambiamenti sulla qualità e attività della microflora intestinale, promuovendo evidenti benefici nell’ospite.

Perché possa esser definita prebiotico una sostanza deve rispondere a tre requisiti fondamentali (Gibson et al., 2004; Roberfroid, 2007):

- capacità di resistere all’acidità gastrica, all’attività di idrolisi da parte degli enzimi digestivi e all’assorbimento intestinale;
- essere suscettibile all’azione fermentativa della microflora intestinale;
- capacità di stimolare in modo selettivo la crescita e/o l’attività di specifici ceppi batterici considerati benefici per la salute dell’ospite.

Gli NDO sono prodotti principalmente attraverso tre vie:

1. Estrazione con acqua calda da fonti naturali quali cicoria, topinambur, carciofo, banana, grano, soia, da cui si ricavano inulina (Franck, 2002) ed oligosaccaridi della soia (SOS).
2. Idrolisi enzimatica parziale di oligosaccaridi o polisaccaridi; ad esempio, i fruttooligosaccaridi (FOS) derivano per idrolisi dell’inulina (Kaur e Gupta, 2002) mentre gli xilooligosaccaridi (XOS) sono prodotti per azione delle xilanasi su polimeri dello xilano (Imaizumi et al., 1991).

3. Sintesi enzimatica da una o più miscele di oligosaccaridi, ad esempio i FOS ricavati dal saccarosio (Spiegel et al., 1994) e i GOS (galattooligosaccaridi) prodotti dal lattosio per azione delle β -galattosidasi (Torres et al., 2010).

Gli oligosaccaridi non digeribili che più comunemente trovano impiego nell'industria del pet food sono l'inulina, i mannanooligosaccaridi (MOS) e i FOS (Verdonk et al., 2007).

3.2 Effetti delle sostanze prebiotiche sull'ospite

3.2.1 Effetti sulla composizione del microbiota intestinale

Gli effetti dell'inclusione nella dieta di specifici substrati prebiotici sulla microflora intestinale del cane e del gatto sono stati studiati da numerosi autori, ottenendo talvolta risultati discordanti. Ad esempio, in uno studio condotto su cani adulti è stato osservato come la somministrazione di crescenti dosi di oligofruuttosio (3, 6 e 9 g/kg di dieta) abbia indotto un aumento della popolazione aerobica e una riduzione delle conte di *C. perfringens*, senza tuttavia influenzare le popolazioni fecali di lattobacilli e bifidobatteri (Flickinger et al., 2003a). Quest'ultimo risultato è stato osservato anche da Swanson et al. (2002b) in cani adulti riceventi FOS (2 g/d). In un altro studio, Howard et al. (2000) hanno descritto l'aumento della popolazione aerobica nella porzione distale del colon di cani adulti riceventi FOS (15 g/kg di dieta) rispetto a quelli riceventi una dieta integrata con cellulosa (60 g/kg). Un incremento delle conte fecali di bifidobatteri è stato osservato in cani riceventi cicoria (10 g/kg di dieta) o MOS (10 g/kg di dieta); inoltre, l'inclusione di MOS ha determinato una riduzione delle conte fecali di *E. coli* (Grieshop et al., 2004). Contrariamente a quanto osservato nello studio di Grieshop et al. (2004), le concentrazioni fecali di bifidobatteri non sembrano risentire dell'inclusione di FOS, MOS o XOS nella dieta di cani adulti, mentre è stata osservata una riduzione delle conte di *C. perfringens* conseguentemente all'uso dei suddetti supplementi (Strickling et al., 2000). Nonostante i MOS vengano spesso descritti come oligosaccaridi non digeribili con proprietà prebiotiche, essi in realtà non vengono fermentati dalla flora microbica considerata benefica; tuttavia, essi agiscono da stimolatori del sistema immunitario, legando e allontanando specie patogene dal tratto gastroenterico (Spring et al., 2000). Quest'ultima osservazione è stata riportata anche da Middelbos et al. (2007), i quali hanno osservato una tendenza alla riduzione delle conte di *E. coli* in cani riceventi una combinazione di FOS e

MOS, ipotizzando la capacità dei MOS di legarsi alle fimbrie di alcune specie patogene e prevenendone in questo modo la colonizzazione. Mentre nello studio di Barry et al. (2009) non sono state osservate modificazioni sul microbiota fecale di cani adulti in seguito alla supplementazione della dieta con FOS e inulina, Vanhoutte et al. (2005) hanno evidenziato gli effetti positivi di oligofruttosio e inulina sulle conte di streptococchi fecali.

In uno studio di Biagi et al. (2010a), numerose fonti di fibra e sostanze prebiotiche sono state testate, sia *in vitro* che *in vivo*, sul cane. Tra le sostanze testate *in vitro*, FOS, inulina, lattitolo, fibre di *psyllium* e pectine da agrumi e mela sono risultate rapidamente utilizzabili dal microbiota fecale, suscitando una riduzione del pH degli inoculi fecali. Inoltre, il lattitolo ha mostrato un evidente effetto positivo riducendo, *in vivo*, le concentrazioni fecali di coliformi e *C. perfringens*.

Le polpe di bietola, una fonte di fibre comunemente impiegata nel pet food, sembrano indurre modificazioni negative sul microbiota fecale del cane, incrementando il numero di sequenze di Firmicutes (in cui rientrano i clostridi) e riducendo il numero di sequenze di *Actinobacteria*, il cui phylum include il genere *Bifidobacterium* (Middelbos et al., 2010). Anche nel già citato studio di Biagi et al. (2010a) sono stati osservati, *in vitro*, gli effetti negativi dovuti all'inclusione di polpe di bietola, quali l'incremento di pH e di coliformi negli inoculi fecali.

Anche il sequenziamento shotgun eseguito su gli stessi campioni ottenuti dal lavoro di Middelbos et al. (2010) ha evidenziato l'aumento del phylum Firmicutes, oltre che del gruppo Bacteroidetes/Chlorobi; peraltro, l'analisi metagenomica delle sequenze non ha mostrato nessuna variazione significativa tra le principali categorie funzionali (Swanson et al., 2011).

Nel gatto, gli effetti dell'aggiunta nella dieta di FOS (4%) o pectina (4%) rispetto a una dieta contenente il 4% di cellulosa sono stati valutati mediante qPCR (Barry et al., 2010), facendo emergere il ruolo positivo dei FOS nell'incrementare le concentrazioni di *Bifidobacterium* spp. e ridurre quelle di *E. coli*. Tuttavia, nei gatti riceventi l'integrazione con pectina è stato osservato un aumento delle concentrazioni di *Lactobacillus* spp. ma anche di batteri potenzialmente patogeni quali *C. perfringens* ed *E. coli*. Questi risultati sono in contrasto con quanto osservato da Pinna et al. (2014), dove l'aggiunta di pectina da agrumi ha indotto, *in vitro*, un calo delle concentrazioni di enterobatteriacee. Sempre nel gatto, l'integrazione della dieta con FOS ha provocato un incremento delle popolazioni

fecali di *Lactobacillus* spp. e *Bacteroides* spp. e una tendenza alla riduzione delle conte di *E. coli* e *C. perfringens* (Sparkes et al., 1998b), mentre in una precedente prova (Sparkes et al., 1998a) condotta su gatti riceventi FOS (0.75%) non sono state osservate differenze tra le popolazioni batteriche residenti nel duodeno, presumibilmente a causa della bassa percentuale di inclusione di fruttooligosaccaridi nella dieta. Secondo Kanakupt et al. (2011), l'uso dei GOS (0.5%) o la loro associazione con FOS (0.5% GOS + 0.5% FOS) è risultato maggiormente efficace nel determinare un aumento delle conte fecali di *Bifidobacterium* spp. rispetto alla sola inclusione nella dieta di FOS, mentre nessuno dei trattamenti ha sortito alcun effetto sulle popolazioni di *Lactobacillus* spp., *C. perfringens* ed *E. coli*.

Mediante sequenziamento shotgun è stato possibile effettuare l'analisi metagenomica su campioni fecali di gatti riceventi diete simili a quelle già impiegate nel precedente studio di Barry et al. (2010) (Barry et al., 2012). Il numero di sequenze relative al phylum Actinobacteria è risultato più alto in seguito alla supplementazione con FOS, mentre l'aggiunta di pectina ha indotto un aumento proporzionale dei Firmicutes e dei batteri totali. L'analisi metagenomica ha inoltre evidenziato come i FOS incrementino il numero di sequenze geniche dedicate al metabolismo aminoacidico, mentre il consumo della dieta addizionata di pectina è stato correlato ad un aumento dei geni implicati nel metabolismo dell'azoto.

Osservando i dati riportati dai succitati studi, nonostante alcune discrepanze, l'uso delle sostanze prebiotiche rappresenta un'efficace strategia nutrizionale utile a modificare l'habitat gastroenterico, riducendo le popolazioni potenzialmente patogene e incrementando le concentrazioni di batteri considerati virtuosi. Inoltre, tra tutti i supplementi testati, oligofruzzosio e fruttooligosaccaridi quando usati in concentrazioni superiori 10 g/kg di dieta, sembrano essere le sostanze più indicate nel modulare positivamente il microbiota intestinale del cane e del gatto.

3.2.2 Influenza sulla produzione di acidi grassi volatili

Gli acidi grassi volatili sono i principali prodotti derivanti dalla fermentazione dei carboidrati: molteplici studi riguardanti numerose specie animali hanno infatti riportato aumentate concentrazioni di questi cataboliti nelle *digesta* in seguito all'assunzione di diete contenenti sostanze ad azione prebiotica (Aumiller et al.,

2015; Kellow et al., 2014; Pinna e Biagi, 2014; Rochus et al., 2014). È stato osservato come la concentrazione di questi metaboliti vari lungo il tratto enterico (Stevens e Hume, 1998) e come, a causa del rapido assorbimento da parte della mucosa intestinale, solamente il 5% degli AGV derivanti dalle fermentazioni batteriche possa essere rilevato nelle feci (Topping e Clifton, 2001); ciò potrebbe spiegare le differenze che spesso si osservano tra studi *in vivo* e studi che si avvalgono di modelli *in vitro*.

Nello studio *in vitro* condotto da Biagi et al. (2010a) è stato osservato come alcune sostanze prebiotiche possano influenzare il metabolismo della microflora canina, incrementando la concentrazione di AGV totali negli inoculi fecali (lattitolo, +18%; inulina da cicoria, +17%; pectina da mela, +15%; fibra di *psyllium*, +21%; gomma di guar, +69%). Risultati simili sono stati osservati in cani riceventi oligofruttosio (Flickinger et al., 2003a), inulina o oligofruttosio (Propst et al., 2003) e polidestrosio (Beloshapka et al., 2012b). In cani riceventi dosi crescenti di FOS è stata osservata una riduzione del pH fecale conseguente all'aumentata produzione di acido lattico (Twomey et al., 2003); è stato altresì riportato come il consumo di FOS determini un incremento delle concentrazioni fecali di acido propionico (Flickinger et al., 2003a; Swanson et al., 2002b), metabolita derivante dall'utilizzo a fini energetici del lattato, sia negli animali monogastrici (Duncan et al., 2004; Ushida et al., 2002) che nei ruminanti (McSweeney et al., 1994).

Nonostante il colon piuttosto breve e la mancanza di un cieco funzionale conseguente all'adattamento evolutivo ad una dieta strettamente carnivora, anche nel tratto enterico del gatto sono stati osservati fenomeni fermentativi microbici non trascurabili (Brosey et al., 2000). Il microbiota del gatto è infatti in grado di utilizzare a fini energetici una larga varietà di substrati fibrosi vegetali e oligosaccaridi (Biagi et al., 2013; de Godoy et al., 2013; Pinna et al., 2014; Sunvold et al., 1995a, 1995b), la cui fermentazione nel colon esita nella produzione di acidi grassi volatili in concentrazioni paragonabili a quelle riscontrate nei prestomaci dei ruminanti e nel colon di altre specie monogastriche, mentre le concentrazioni osservate nel piccolo intestino sono risultate essere maggiori rispetto ai valori riportati per altre specie animali (Brosey et al., 2000).

Nel gatto, secondo quanto riferito da Barry et al. (2010), l'assunzione di pectina determina l'incremento delle concentrazioni fecali di acido propionico e butirrico, mentre la somministrazione di fruttooligosaccaridi esita in una maggiore

produzione di butirrato. Nell'uomo, il principale metabolita derivante dall'utilizzazione delle pectine è l'acetato (84% degli AGV totali) a cui segue il propionato (14% degli AGV totali; Englyst, 1987). Secondo gli Autori (Barry et al., 2010), le elevate concentrazioni di acido propionico e butirrico riscontrate potrebbero essere attribuibili ad un incremento della quota di amido che raggiunge cieco e colon, la cui fermentazione origina principalmente acido acetico (50% degli AGV totali) ma anche propionato e butirrato (rispettivamente 22 e 29% degli AGV totali; Englyst, 1987). È noto infatti come le pectine, in virtù della loro capacità di formare gel, incrementino la viscosità nel lume intestinale riducendo la digeribilità dell'amido e aumentandone, di conseguenza, la quota indigerita che raggiunge il grosso intestino (Zacharias et al., 2004).

Le aumentate concentrazioni di butirrato osservate nei gatti riceventi FOS da Barry et al. (2010) rispecchiano quanto riportato *in vitro* da Pinna et al. (2014) e, *in vivo*, in gatti riceventi oligofruzzosio o inulina (rispettivamente 3 e 6% della dieta; Hesta et al., 2001.) o una combinazione di GOS e FOS (Kanakupt et al., 2011). Curiosamente, in nessuno degli studi sul gatto sopra citati l'uso dei FOS ha determinato alcun incremento nelle concentrazioni fecali di acido propionico. Nel cane, al contrario, è stato osservato come l'integrazione della dieta con FOS esiti in un'aumentata produzione non solo di butirrato (Propst et al., 2003; Swanson et al., 2002a) ma anche di propionato, sia *in vitro* (Biagi et al., 2010a) che *in vivo* (Flickinger et al., 2003a; Swanson et al., 2002c).

3.3 Le proteine nell'alimentazione del cane e del gatto

Le proteine costituiscono elementi chiave nell'alimentazione degli animali da compagnia, poiché forniscono all'animale un fondamentale apporto di aminoacidi essenziali e non che vengono utilizzati principalmente per la costruzione del tessuto muscolare e per soddisfare le funzioni metaboliche dell'organismo (Dust et al., 2005). Inoltre, le proteine rappresentano la principale fonte di azoto, utilizzato per la sintesi endogena degli aminoacidi non essenziali e di altre molecole quali acidi nucleici, purine e pirimidine (Case et al., 2011).

Le fonti proteiche impiegate nell'alimentazione degli animali da compagnia sono costituite da sottoprodotti di diversa origine: principalmente sono di derivazione animale, ma anche vegetale o la combinazione di fonti animali e vegetali (Case et al., 2011). Tra le fonti di origine animale vengono comunemente impiegate farine

di carne, di ossa, di pollame e di pesce, ma anche uova disidratate (Cramer et al., 2007). Le farine di glutine di mais, di erba medica, di soia, di semi di lino e germe di grano rientrano tra le fonti proteiche comunemente impiegate nell'industria del pet food (Case et al., 2011; Zentek e Mischke, 1997).

Fonti proteiche di bassa qualità sono correlate a una minor digeribilità intestinale, a causa dell'elevata quantità di collagene nelle materie prime impiegate o dei trattamenti termici cui vanno incontro nell'industria mangimistica (Zentek et al., 2003).

I trattamenti termici a cui vengono sottoposti i sottoprodotti della lavorazione delle carni e la presenza di elevate quantità di ceneri sono spesso responsabili di un peggioramento della digeribilità della matrice proteica (Cramer et al., 2007; Johnson e Parsons, 1997). Quando le fonti proteiche vengono trattate con il calore oppure sottoposte ad elevate pressione di vapore, gli aminoacidi possono essere distrutti o alterati al punto da divenire inutilizzabili dall'animale (Wang e Parsons, 1998). La lisina e la metionina sono gli aminoacidi più suscettibili all'azione termica, così come treonina, leucina, valina e fenilalanina. Johnson e Parsons (1997) hanno evidenziato come gli aminoacidi presenti in farine di carne diminuissero in seguito a trattamenti termici, portandosi dall'85% al 35% in seguito ad un innalzamento di temperatura da 125 a 150 °C.

3.4 Le fermentazioni proteiche del microbiota intestinale

I carboidrati rappresentano la fonte energetica d'elezione per le fermentazioni batteriche ma, qualora questi si esauriscano o siano scarsamente disponibili, i microorganismi intestinali possono utilizzare come fonte di carbonio alternativa le proteine indigerite introdotte con la dieta e le proteine di origine endogena, quali mucine, enzimi pancreatici, cellule di sfaldamento dell'epitelio e cellule batteriche lisate (Cummings e Macfarlane, 1991; Davila et al., 2013; Gibson et al., 1996; Nery et al., 2012; Scott et al., 2013).

La fermentazione nel grosso intestino delle matrici proteiche, a causa della minor produzione di AGV che ne deriva, forniscono all'ospite una quota energetica inferiore rispetto alla fermentazione dei carboidrati (Macfarlane et al., 1992).

La capacità di fermentare peptidi e aminoacidi è propria di numerosi gruppi batterici proteolitici, ma anche di alcuni gruppi saccarolitici (Davila et al., 2013). Tra i gruppi proteolitici più frequentemente isolati riconosciamo *Bacteroides*,

Fusobacterium, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Actinomyces*, *Peptococcus*, *Ruminococcus* ed *Enterobacteriaceae* (Dai et al., 2011; Smith e Macfarlane, 1996a). Nonostante la digestione e l'assorbimento delle proteine alimentari possano essere considerati dei processi biologici efficienti (Baglieri et al., 2007; Bos et al., 2005; Gaudichon et al., 1999; Gausserès et al., 1996; Mariotti et al., 2001), sensibili quantità di sostanze azotate possono raggiungere il grosso intestino. È stato osservato come nel colon del cane giungano ogni giorno da 218 a 650 g di proteine per kg di sostanza secca di contenuto luminale (Zentek, 1995a). La quantità è correlata alla digeribilità (Wiernusz et al., 1995) e alla percentuale di inclusione della matrice proteica nella dieta (Yamka et al., 2003), oltre che all'assunzione di sostanza secca (Hussein e Sunvold, 2000). Il grosso intestino è il principale sito attivo delle fermentazioni proteolitiche mediate dal microbiota. È stato dimostrato come le proteasi siano più attive in ambiente neutro o leggermente alcalino (Macfarlane et al., 1988): questo, in combinazione con una minor velocità di transito delle ingesta e una scarsa disponibilità di carboidrati, può spiegare come l'attività proteolitica sia massima nella porzione distale del colon rispetto al tratto prossimale, il quale presenta un pH luminale più basso (Cummings e Macfarlane, 1991). Le fermentazioni putrefattive che hanno luogo nel colon portano all'accumulo di numerosi cataboliti quali ammoniaca, amine biogene, fenolo, indolo e solfiti, acidi grassi ramificati e acidi grassi a corta catena, gas (H_2 , CO_2 , CH_4) e alcuni prodotti intermedi quali lattato e succinato (Cummings e Macfarlane, 1991; Hughes et al., 2000). Mentre gli acidi grassi volatili a corta catena rappresentano un'importante fonte di energia per la mucosa intestinale, agli altri composti sono state riconosciute proprietà tossiche e cancerogene ai danni dei colonociti e, conseguentemente, dell'ospite (Davila et al., 2013; Hussein et al., 1999; Macfarlane et al., 1988; Mouillé et al., 2004; Nyangale et al., 2012; Salonen e de Vos, 2014).

3.4.1 I cataboliti di origine proteolitica

L'ammoniaca è un catabolita tossico prodotto dalla deaminazione microbica degli aminoacidi oppure per idrolisi dell'urea da parte di ureasi batteriche (Warren e Newton, 1959). Quantitativi cospicui di ammoniaca vengono rapidamente assorbiti dalla mucosa e immessi nel sangue dove, tramite la vena porta, giungono al fegato per essere convertiti in urea ed in seguito eliminati con le urine (Summerskill e

Wolpert, 1970). Nell'uomo e nel ratto elevate concentrazioni di ammoniaca sono state correlate all'insorgenza dell'encefalopatia epatica, alla patogenesi del tumore al colon, delle coliti e all'ipersensibilità del colon (Bajka et al., 2008; Hughes et al., 2000; Royall et al., 1990; Vippera e O'Keefe, 2012). Inoltre, l'ossidazione degli acidi grassi volatili a livello dei colonociti sembra essere inibita in presenza di alti livelli di ammoniaca (Cremin et al., 2003; Darcy-Vrillon et al., 1996). Alcuni Autori hanno osservato qualora l'energia apportata dai carboidrati indigeribili assunti con la dieta risulti essere appropriata, il microbiota intestinale può utilizzare lo ione ammonio quale fonte di azoto per la costruzione di proteine batteriche, riducendo la presenza di ammoniaca libera nel lume intestinale e limitandone l'azione tossica (Bernalier-Donadille, 2010; Mosenthin et al., 1992). Alte concentrazioni di ammoniaca sono state inoltre correlate ad una diminuzione dell'altezza dei villi intestinali nel suino (Nousiainen, 1991) e ad un non corretto sviluppo della mucosa del grosso intestino nell'uomo (Visek, 1984). Secondo Toden et al. (2006, 2005), alti livelli di proteina nella dieta sono legati allo sviluppo di una mucosa del colon anormalmente sottile e con un ridotto effetto barriera, caratteristico degli animali affetti da IBD.

Il solfuro di idrogeno (H_2S) è un metabolita derivato dalla riduzione degli aminoacidi solforati (cisteina, cistina, metionina e taurina) ad opera di specifici enzimi prodotti dai batteri solfato-riduttori *Desulfovibrio* spp. e *Desulfomonas* spp. che coabitano il grosso intestino (Awano et al., 2005; Smith e Macfarlane, 1997a). Anche altri gruppi batterici quali enterococchi, enterobatteriacee, peptostreptococchi, fusobatteri ed eubatteri sono stati identificati come capaci di fermentare gli aminoacidi solforati (Smith e Macfarlane, 1997a). La presenza di eccessive concentrazioni di H_2S nell'uomo è stata associata a mutazioni del DNA genomico (Attene-Ramos et al., 2010, 2007) e all'insorgenza di stati infiammatori dovuti ad un'alterazione dell'effetto barriera dei colonociti (Pitcher e Cummings, 1996). Le proprietà lipofile del solfuro di idrogeno ne permettono l'attraversamento delle membrane biologiche (Reiffenstein et al., 1992) e la conseguente inibizione dell'attività catalitica della citocromo-c ossidasi (Hill et al., 1984) influenzando negativamente, al pari dell'ammoniaca, sull'utilizzazione dell'energia da parte dei colonociti (Leschelle et al., 2005).

Le poliamine sono composti organici di fondamentale importanza poiché implicate nella proliferazione e differenziazione cellulare (Heby, 1981). Sono prodotte in

basse concentrazioni durante la normale attività dei colonociti a partire da differenti aminoacidi precursori (Elitsur et al., 1993; Mouillé et al., 1999). Al contrario, un'elevata capacità di sintesi di poliamine caratterizza le cellule neoplastiche del colon, causa la necessità di un continuo turnover cellulare (Blachier et al., 1995).

Alcuni gruppi batterici quali *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus* e *Butyvirio* appaiono coinvolti nella produzione di una grande varietà di amine a partire dalla decarbossilazione di aminoacidi e peptidi (Allison e Macfarlane, 1989; Hanfrey et al., 2011; Matsumoto e Benno, 2007; Smith e Macfarlane, 1996b). In base al numero di gruppi aminici questi composti si differenziano in monoamine (tiramina e dimetilamina) e in poliamine (cadaverina, agmatina, istamina, spermidina, putrescina e spermina). Pur possedendo importanti ruoli biologici, eccessivi livelli di poliamine possono determinare effetti tossici sulla mucosa intestinale (Morris, 1991). Inoltre, alcuni pathways catabolici delle poliamine possono portare alla produzione di ammoniaca, acroleina, nitrosammina e perossido di idrogeno, riconosciute come sostanze potenzialmente mutagene e cancerogene nell'uomo (Di Martino et al., 2013; Pegg, 2013; Scott et al., 2013).

La degradazione batterica degli aminoacidi aromatici conduce alla produzione di composti fenolici ed indolici, i quali sembrano agire come sostanze cancerogene (Nowak e Libudzisz, 2006). Dal catabolismo della tirosina hanno origine fenolo, *p*-cresolo e 4-etilfenolo, mentre composti simili hanno origine dalla degradazione della fenilalanina (fenil-piruvato, fenil-acetato, fenil-lattato e fenil-propionato); indolo e scatolo derivano invece dalla fermentazione del triptofano (Smith e Macfarlane, 1997b; Windey et al., 2012). I composti fenolici e indolici derivano esclusivamente dal metabolismo del microbiota intestinale e possono essere utilizzati come marker per stimare l'entità delle fermentazioni proteolitiche nel colon (Geypens et al., 1997).

Nonostante gli acidi grassi volatili a corta catena derivino principalmente dalla fermentazione dei carboidrati (Laparra e Sanz, 2010), una quota sensibile di questi ha origine dalla degradazione della quota proteica indigerita (Mortensen et al., 1990). È stato osservato come numerosi aminoacidi fungano da precursori per la sintesi di acidi grassi volatili: l'acetato viene prodotto a partire dalla fermentazione

batterica della glicina, treonina, alanina, glutammato, lisina e aspartato (Barker, 1981; Elsdon e Hilton, 1978). Il butirrato ha origine dagli aminoacidi glutammato e lisina (Macfarlane e Cummings, 1991), mentre il propionato può essere sintetizzato a partire da alanina e treonina (Macfarlane e Gibson, 1995). Gli acidi grassi a catena ramificata (isobutirrato, 2-metilbutirrato e acido isovalerico) originano rispettivamente dalla degradazione da parte del microbiota degli aminoacidi valina, isoleucina e leucina (Macfarlane e Cummings, 1991) e rappresentano una piccola percentuale di tutti gli acidi grassi volatili presenti nel contenuto luminale del colon (Mortensen e Clausen, 1996). Al pari dei composti fenolici ed indolici vengono prodotti esclusivamente a partire dal catabolismo microbico delle proteine (Nordgaard et al., 1995; Rasmussen et al., 1988). Al contrario degli acidi grassi volatili, il cui significato biologico è ben noto, poco si conosce sul ruolo che gli acidi grassi a catena ramificata esplicano sul metabolismo dei colonociti (Charney et al., 1999; Dagher et al., 1996; Diener et al., 1993; Musch et al., 2001; Zaharia et al., 2001).

4 Scopo della ricerca

Gli obiettivi del presente lavoro sono stati:

- valutare *in vitro* gli effetti sulla composizione ed il metabolismo della microflora fecale del gatto di una dieta a basso tenore proteico e di una dieta ad alto tenore proteico e bassa digeribilità, in combinazione con alcune sostanze prebiotiche.
- verificare *in vitro* gli effetti sul microbiota intestinale del cane di diete a diverso tenore proteico e contenenti proteine a diversa digeribilità in presenza o meno di fruttooligosaccaridi.
- verificare gli effetti sul microbiota intestinale del cane di diete a diverso tenore proteico e contenenti proteine a diversa digeribilità in presenza o meno di fruttooligosaccaridi.
- valutare *in vitro* degli effetti di un estratto a base di tannini e *Yucca schidigera* sul microbiota intestinale del gatto.
- determinare gli effetti di dosi crescenti di lattosio sul benessere intestinale del cane adulto.

5 Impatto di diversi quantitativi di proteina e di alcune sostanze prebiotiche sul microbiota fecale del gatto

5.1 Materiali e metodi

Quattro gatti adulti (femmine di razza europea; peso corporeo medio 4 kg; età media 5 anni) di proprietà di privati e viventi confinati in appartamento sono stati alimentati per 4 settimane con una dieta secca commerciale per gatti adulti (COOP Italia, Bologna, Italy), formulata con i seguenti ingredienti: cereali, carne e sottoprodotti della carne, sottoprodotti di origine vegetale, pesci e sottoprodotti dei pesci, estratti di proteine vegetali, olii e grassi, minerali e vegetali.

Le feci dei gatti sono state raccolte immediatamente dopo l'escrezione, mescolate tra loro e diluite 1:10 p/v in Wilkins Chalgren Anaerobe Broth (WCAB 0.5x; Oxoid, Basingstoke, UK). L'inoculo fecale così ottenuto è stato ulteriormente diluito in terreno di arricchimento (100 ml/L), secondo quanto proposto da Sunvold et al. (1995b; tabella 1) e dispensato in 5 boccette da 30 mL per ciascun trattamento. Ciascuna boccetta conteneva il residuo indigerito della stessa dieta precedentemente somministrata ai gatti donatori, sottoposta a digestione in vitro secondo la metodica proposta da Vervaeke et al. (1989) e modificata (2 h di incubazione con HCl, pepsina e lipasi gastrica seguita da 4 h di incubazione con pancreatina e sali biliari) come descritto da Biagi et al. (2010a). La composizione della dieta somministrata agli animali e del suo residuo indigerito è riportata nella tabella 2.

Tabella 1 - Composizione del terreno di arricchimento usato nella presente prova (Sunvold et al., 1995b, modificato)

| Componente | Concentrazione |
|--|----------------|
| | <i>ml/L</i> |
| Soluzione A ⁽¹⁾ | 330.0 |
| Soluzione B ⁽²⁾ | 330.0 |
| Soluzione oligoelementi ⁽³⁾ | 10.0 |
| Soluzione vitamine idrosolubili ⁽⁴⁾ | 20.0 |
| Soluzione folati e biotina ⁽⁵⁾ | 5.0 |
| Soluzione riboflavina ⁽⁶⁾ | 5.0 |
| Soluzione emina ⁽⁷⁾ | 2.5 |
| Acqua deionizzata | 302.5 |
| | <i>g/L</i> |
| Estratto di lievito | 0.5 |
| Tryptone | 0.5 |
| Cisteina HCl H ₂ O | 0.5 |
| Na ₂ CO ₃ | 4.0 |

⁽¹⁾ Composizione g/L: NaCl, 5.4; KH₂PO₄ 2.7; CaCl₂ H₂O 0.16; MgCl₂ 6H₂O, 0.12; MnCl₂ 4H₂O, 0.06; CoCl₂ 6H₂O, 0.06; (NH₄)₂SO₄, 5.4.

⁽²⁾ Composizione g/L: K₂HPO₄, 2,7.

⁽³⁾ Composizione mg/L: EDTA (sale disodico), 500; FeSO₄ 7H₂O, 200; ZnSO₄ 7 H₂O, 10; MnCl₂ 4 H₂O, 3; H₃PO₄, 30; CoCl₂ 6H₂O, 20; CuCl₂ 2H₂O, 1; NiCl₂ 6H₂O, 2; Na₂MoO₄ 2H₂O, 3.

⁽⁴⁾ Composizione mg/L: tiamina HCl, 100; acido d-pantotenico, 100; niacina, 100; piridossina, 100; acido p-amminobenzoico, 5; vitamina B₁₂, 0,25.

⁽⁵⁾ Composizione mg/L: acido folico, 10; biotina, 2; NH₄HCO₃, 100.

⁽⁶⁾ Composizione: riboflavina 10 mg/L in una soluzione 5 mmol/L di HEPES (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico).

⁽⁷⁾ Emina, 500 mg/L in una soluzione 10 mmol/L di NaOH.

Due prove *in vitro* sono state condotte. Nel primo studio preliminare, gli effetti di 7 trattamenti sono stati valutati: 1) dieta di controllo (CTRL) senza nessuna aggiunta di sostanze prebiotiche; 2) acido gluconico (GA; sale sodico dell'acido gluconico, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 3) fibra di carota (CF; 140 g/kg di fibra solubile e 780 g/kg di fibra insolubile, Chimab Food Ingredients, Padova, Italia); 4) FOS (inulina da cicoria parzialmente idrolizzata, grado di polimerizzazione compreso tra 3 e 7, Beneo P95, BENE0-Orafti, Oreye, Belgio); 5) GOS (Vivinal GOS 10, ottenuto da siero di latte, contenente 29% GOS e 36% lattosio, Friesland Foods Domo, Zwolle, Paesi Bassi); 6) Lattitolo (LAC; Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 7) pectina da agrumi (PEC; Pectin Classic CU201, grado di esterificazione compreso tra 70 e 74%, Herbstreith & Fox KG, Neuenbürg/Württ, Germania). I substrati prebiotici ed il residuo indigerito della dieta sono stati aggiunti all'inoculo fecale ad una concentrazione finale rispettivamente di 2 g/L e di 20 g/L. La scelta di queste concentrazioni rispecchia l'ammontare di oligosaccaridi che dovrebbero raggiungere il grosso intestino qualora il soggetto assuma una dieta commerciale secca per gatti addizionata di sostanze prebiotiche in ragione di 10 g/kg. Infatti, se consideriamo il coefficiente di digeribilità di un alimento *super premium* pari a 0.9 e assumendo che tutto il supplemento prebiotico raggiunga il colon, il rapporto tra la quota indigerita della dieta e il prebiotico nel grosso intestino sarà approssimativamente 10:1.

Per la seconda prova *in vitro*, FOS e LAC sono stati selezionati per essere testati in presenza di due diversi livelli proteici. Gli effetti di 6 trattamenti sono stati valutati: 1) dieta di controllo (CTRL) a basso titolo proteico (LP) e senza aggiunta di prebiotici (CTRL-LP); 2) dieta di controllo (CTRL) ad alto titolo proteico (HP) e senza aggiunta di prebiotici (CTRL-HP); 3) dieta LP + FOS; 4) dieta LP + LAC; 5) dieta HP + FOS; 6) dieta HP + LAC. Sia FOS che LAC sono stati aggiunti all'inoculo fecale in ragione di 2 g/L. Il trattamento CTRL-LP equivale alla frazione indigerita precedentemente utilizzata nella prima prova *in vitro* (CTRL), mentre il trattamento CTRL-HP è stato ottenuto mescolando in rapporto 1:1 la dieta estrusa precedentemente somministrata ai gatti donatori con una farina di carne di suino e bovino. Questo composto è stato successivamente sottoposto a digestione *in vitro* mediante la metodica precedentemente descritta. La composizione della farina di carne di suino e bovino, della dieta CTRL-HP e del suo residuo indigerito è riportata nella tabella 2.

I trattamenti CTRL-LP e CTRL-HP sono stati addizionati all'inoculo fecale in modo da raggiungere una concentrazione finale rispettivamente di 20 g/L e di 40 g/L. I differenti quantitativi di dieta LP e HP aggiunti all'inoculo intendono rispecchiare il quantitativo di dieta indigerita che potrebbe raggiungere il grosso intestino del gatto, qualora il soggetto venga alimentato con la dieta CTRL-LP (digeribilità in vitro del 76.4%) o con la dieta CTRL-HP (digeribilità in vitro del 53.5%).

Inoltre, per ciascuno studio, 5 ulteriori bottiglie sono state allestite quale controllo negativo, contenenti il solo inoculo fecale e senza l'aggiunta di alcun substrato sperimentale o di frazione indigerita della dieta. Il pH degli inoculi fecali è stato regolato a 6.7; le bottiglie sono state quindi sigillate ermeticamente e poste a incubare in atmosfera controllata (85% N₂, 10% CO₂ e 5% H₂) per 24 h a 39 °C all'interno di una camera anaerobica (Anaerobic System; Forma Scientific Co., Marietta, OH, USA). Campioni di liquido di fermentazione sono stati raccolti da ciascuna bottiglia a 6 e 24 h, immediatamente congelati a -80 °C e destinati alle successive analisi per la determinazione del pH, dell'ammoniaca, delle amine biogene e per la conta delle popolazioni batteriche. I campioni raccolti a 24 h sono stati destinati anche all'analisi gascromatografica per la determinazione degli acidi grassi volatili.

Tabella 2- Composizione chimica delle diete, della farina di carne e delle relative frazioni indigerite¹

| | S.S., % | Proteina grezza | Grassi grezzi | % sulla S.S. | | |
|----------------------------|---------|-----------------|---------------|---------------|--------------|-------|
| | | | | Ceneri grezze | Fibra grezza | Amido |
| <i>Trattamenti</i> | | | | | | |
| Dieta CTRL | 93.7 | 29.5 | 10.0 | 10.4 | 3.53 | 42.4 |
| Dieta CTRL-HP | 96.5 | 46.0 | 9.80 | 17.2 | - | 21.2 |
| Farina suino/bovino | 99.3 | 62.8 | 9.59 | 24.1 | - | - |
| <i>Frazioni indigerite</i> | | | | | | |
| Dieta CTRL | - | 13.5 | 2.24 | 28.1 | - | 5.80 |
| Dieta CTRL-HP | - | 31.1 | 4.60 | 30.2 | - | 1.40 |
| Farina suino/bovino | - | 21.2 | 2.44 | 33.9 | - | - |

¹CTRL = dieta di controllo; CTRL HP = dieta di controllo ad alto titolo proteico.

5.2 Analisi chimiche e microbiologiche dei campioni

Le analisi sulla dieta secca estrusa, sulla farina di carne e sulle frazioni indigerite delle diete sono state condotte seguendo le metodiche standard AOAC (AOAC, 2000; Metodo 954.01 per la proteina grezza, Metodo 920.39 per i lipidi grezzi, Metodo 920.40 per l'amido, Metodo 942.05 per le ceneri grezze, Metodo 962.09 per la fibra grezza). Le frazioni fibrose sono state determinate secondo la metodica proposta da Van Soest et al. (1991). L'ammoniaca è stata determinata mediante l'impiego di un apposito kit commerciale (Urea/BUN-Color, BioSystem S.A., Barcellona, Spagna). Gli acidi grassi volatili sono stati determinati mediante gascromatografia, secondo la metodica descritta da Biagi et al. (2006). Brevemente, la separazione degli analiti è stata realizzata utilizzando una colonna impaccata 80/120 Carbopack B-DA/4% CW 2M (Supelco, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). L'analisi gascromatografica è stata condotta utilizzando un gascromatografo Varian 3400 (Varian Analytical Instruments, Sunnyvale, CA, USA). L'acido pivalico è stato aggiunto un qualità di standard interno (Fussell e McCalley, 1987).

Per la determinazione delle amine biogene, i campioni sono stati preliminarmente diluiti 1:5 (v/v) in acido perclorico 0.3 M (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); successivamente, le amine biogene sono state separate mediante HPLC e quantificate tramite fluorimetria, secondo quanto descritto da Stefanelli et al. (1986).

Le popolazioni batteriche sono state determinate tramite ibridazione fluorescente *in situ* (FISH), utilizzando kit commerciali specifici (Ribo Technologies, Groeningen, Paesi Bassi) per la conta di enterococchi, Enterobacteriaceae, *Clostridium perfringens*, *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp.

Per la quantificazione delle cellule batteriche presenti è stata utilizzata la seguente formula:

$$N^{\circ} \text{ cellule/mL di campione} = \frac{(X \cdot M \cdot Df)}{S}$$

Dove:

X = numero di cellule positive per campo

M = numero totale di campi per l'effettiva superficie del filtro

Df = fattore di diluizione

S = volume del campione in mL

La lettura dei vetrini è stata effettuata mediante un microscopio ad epifluorescenza Nikon Eclipse E-600 (Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Paesi Bassi), equipaggiato con un filtro specifico per osservare la fluorescenza del FITC.

5.3 Analisi statistica

Nel primo studio in vitro, i dati sono stati analizzati tramite ANOVA a una via e test di Dunnett. Nel secondo esperimento, i dati sono stati analizzati mediante ANOVA a 2 vie e test di Newman-Keuls, indicando il livello proteico e il prebiotico come effetti principali. Sia nel primo che nel secondo studio, ciascuna bottiglia ha rappresentato una singola unità sperimentale. Le differenze sono state ritenute statisticamente significative con $P < 0.05$. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite mediante il software Statistica 10.0 (Stat Soft Italia, Padova, Italia).

5.4 Risultati

Prima prova in vitro

Dopo 6 h di incubazione i valori di pH sono stati ridotti ($P < 0.05$) da GA (-0.09) e da FOS (-0.15) rispetto al CTRL. Dopo 24 h di fermentazione, i valori di pH sono risultati rispetto al CTRL significativamente più bassi ($P < 0.05$) in tutti i trattamenti (-0.28 per GA, -0.11 per CF, -0.43 per FOS, -0.26 per GOS, -0.48 per LAC, -0.52 per PEC; tabella 3).

Le concentrazioni di amine biogene e ammoniaca sono riportate nella tabella 3. Dopo 6 h di fermentazione, la concentrazione di ammoniaca è risultata più bassa

($P < 0.05$) rispetto ai controlli nei trattamenti contenenti GOS (-9%). Dopo 24 h di incubazione, concentrazioni minori di ammoniaca rispetto al controllo sono state riscontrate nelle bottiglie di fermentazione contenenti GA (-14%), LAC (-12%) e PEC (-10%); contrariamente, i trattamenti contenenti CF hanno mostrato una concentrazione di ammoniaca più elevata (+11%; $P < 0.05$) rispetto a CTRL. Le concentrazioni di putrescina dopo 24 h di fermentazione sono risultate più alte ($P < 0.05$) rispetto al controllo nei trattamenti contenenti GOS (+96%), FOS (+90%) e LAC (+87%).

La concentrazione degli acidi grassi volatili a 24 h di fermentazione è riportata nella tabella 4. La concentrazione totale di AGV rispetto a CTRL è stata influenzata da CF (+41%), mentre l'acido acetico è stato ridotto da FOS (-13%), GOS (-12%) e LAC (-17%). Rispetto al controllo, il lattitolo ha indotto un aumento del propionato nel liquido di fermentazione (+8%; $P < 0.05$), mentre la presenza di butirrato è stata incrementata da FOS (+13%), GOS (+15%) e LAC (+10%).

Le conte delle popolazioni batteriche prese in esame sono riportate in tabella 5. Dopo 6 h e 24 h di incubazione, le conte delle popolazioni di enterococchi, lattobacilli e bifidobatteri non hanno risentito degli effetti di nessun trattamento ($P > 0.05$). Al contrario, le conte di *Clostridium perfringens* sono risultate maggiori ($P < 0.05$) nelle bottiglie di fermentazione contenenti CF (+1.5 log cellule/mL), FOS (+1.9 log cellule/mL) e LAC (+1.6 log cellule/mL). Dopo 24 h di fermentazione, la presenza di LAC e PEC ha ridotto le conte di enterobatteri (rispettivamente -0.3 e -0.4 log cellule/mL; $P < 0.05$).

Seconda prova in vitro

I valori di pH a 6 h e 24 h di fermentazione sono riportati in tabella 6.

Dopo 6 h di incubazione i valori di pH sono stati influenzati ($P < 0.05$) dalla quota proteica (6.74 vs. 6.94 per LP e HP, rispettivamente) ma non dalla presenza dei prebiotici, mentre a 24 h di fermentazione i valori di pH hanno risentito della presenza sia dei diversi livelli proteici (5.94 vs. 6.42 per LP e HP, rispettivamente) che dell'inclusione dei prebiotici (6.42 vs. 6.07 e 6.08 per CTRL vs. FOS e LAC, rispettivamente). Al termine delle 24 h di incubazione, le concentrazioni di ammoniaca nel liquido di fermentazione sono state influenzate ($P < 0.05$) dal livello proteico (36.2 vs. 50.2 mmol/L per LP e HP, rispettivamente), mentre la presenza delle sostanze prebiotiche non ha sortito alcun tipo di effetto (tabella 6)

La concentrazione delle amine biogene è riportata in tabella 7. Dopo 6 h di incubazione, il livello proteico ha avuto effetti ($P < 0.05$) sulle concentrazioni di cadaverina (180 vs. 214 $\mu\text{mol/L}$ per LP e HP, rispettivamente), spermidina (38.6 vs. 73.8 $\mu\text{mol/L}$ per LP e HP, rispettivamente) e spermina (8.2 vs. 23.6 $\mu\text{mol/L}$ per LP e HP, rispettivamente). Al termine delle 24 h, le concentrazioni di putrescina nel liquido di fermentazione sono state influenzate ($P < 0.05$) sia dal livello proteico (915 vs. 1091 $\mu\text{mol/L}$ per LP e HP, rispettivamente), sia dalla presenza di oligosaccaridi (806 vs. 1246 e 958 $\mu\text{mol/L}$ per CTRL vs. FOS e LAC, rispettivamente), mentre le concentrazioni di spermidina (37.1 vs. 54.6 $\mu\text{mol/L}$ per LP e HP, rispettivamente) e spermina (11.1 vs. 17.8 $\mu\text{mol/L}$ per LP e HP, rispettivamente) hanno risentito esclusivamente degli effetti della quota proteica ($P < 0.05$).

La concentrazione degli acidi grassi volatili totali è stata influenzata ($P < 0.05$) dal livello proteico (40.9 vs. 32.6 mmol/L per LP e HP, rispettivamente; tabella 8). Sia la presenza di oligosaccaridi che il livello proteico hanno modificato significativamente ($P < 0.05$) i rapporti di acetato (42.7 vs. 38.5% per LP e HP, rispettivamente; 47.1 vs. 41.0 e 33.7% per CTRL, FOS e LAC, rispettivamente), propionato (25.7 vs. 21.3% per LP e HP, rispettivamente; 20.6 vs. 20.3 e 29.5% per CTRL, FOS e LAC, rispettivamente), isobutirrato (1.61 vs. 3.07% per LP e HP, rispettivamente, 3.25 vs. 1.54 e 2.23% per CTRL, FOS e LAC, rispettivamente), *n*-butirrato (28.4 vs. 34.9% per LP e HP, rispettivamente; 26.1 vs. 35.9 e 33.0% per CTRL, FOS e LAC, rispettivamente) e acido isovalerico (1.44 vs. 2.25% per LP e HP, rispettivamente; 2.71 vs. 1.22 e 1.61% per CTRL, FOS e LAC, rispettivamente). I risultati relativi alle conte delle diverse popolazioni batteriche sono riportati in tabella 9.

A 6 h di fermentazione, il livello proteico ha sortito effetti ($P < 0.05$) sulle popolazioni di *C. perfringens* (7.21 vs. 6.60 log cellule/mL per LP e HP, rispettivamente), *Lactobacillus* spp. (4.66 vs. 4.35 log cellule/mL per LP e HP, rispettivamente) ed *Enterococcus* spp. (7.33 vs. 6.66 log cellule/ mL per LP e HP, rispettivamente). Dopo 24 di incubazione, la popolazione di Enterobacteriaceae ha risentito ($P < 0.05$) della presenza di fruttooligosaccaridi e lattitolo (8.77 vs. 9.27 e 8.91 log cellule/mL per CTRL vs. FOS e LAC, rispettivamente), mentre le conte di *C. perfringens* (5.85 vs. 6.40 log cellule/mL per LP e HP, rispettivamente), *Lactobacillus* spp. (4.22 vs. 3.74 log cellule/mL per LP e HP, rispettivamente) ed

Enterococcus spp. (7.32 vs. 6.86 log cellule/mL per LP e HP, rispettivamente) sono state influenzate dal livello proteico ($P < 0.05$). Le popolazioni di *Bifidobacterium* spp. non hanno risentito dell'influenza di nessun trattamento ($P > 0.05$; valori medi di 5.96 e 5.69 log cellule/mL a 6 e 24 h di fermentazione).

Tabella 3- Valori di pH e concentrazioni di ammoniaca (mmol/L) a 6 e 24 h e concentrazione amine biogene ($\mu\text{mol/L}$) a 24 h di incubazione di un inoculo fecale di gatto con una dieta di controllo a cui sono stati aggiunti diversi substrati prebiotici^{1,2}

| | CTRL | GA | CF | FOS | GOS | LAC | PEC | ANOVA <i>P</i> |
|-----------------|------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------|
| <i>6 h</i> | | | | | | | | |
| pH | 6.88 | 6.79 ³ | 6.82 | 6.73 ³ | 6.85 | 6.93 | 6.83 | <0.001 |
| NH ₃ | 32.3 | 33.0 | 32.9 | 32.7 | 30.0 | 30.3 | 31.7 | 0.001 |
| <i>24 h</i> | | | | | | | | |
| pH | 6.31 | 6.03 ³ | 6.20 ³ | 5.88 ³ | 6.05 ³ | 5.83 ³ | 5.79 ³ | <0.001 |
| NH ₃ | 51.2 | 44.1 ³ | 56.8 ³ | 47.2 | 49.6 | 45.3 ³ | 45.9 ³ | <0.001 |
| Putrescina | 607 | 482 | 701 | 1154 ³ | 1192 ³ | 711 | 1136 ³ | <0.001 |
| Cadaverina | 277 | 339 | 310 | 323 | 329 | 334 | 359 | 0.532 |
| Spermidina | 95 | 42 | 143 | 50 | 56 | 101 | 59 | 0.101 |
| Spermine | 97 | 28 | 173 | 21 | 45 | 69 | 54 | 0.278 |

¹I valori si riferiscono alla media delle 5 bottiglie per trattamento

²CTRL = dieta di controllo; GA = acido gluconico; CF = fibra di carota; FOS = fruttooligosaccaridi; GOS = galattooligosaccaridi; LAC = lattitolo; PEC = pectine da agrumi

³Significativamente diverso dal controllo ($P < 0.05$)

Tabella 4 - Concentrazione totale di AGV (mmol/L) e relative proporzioni (%) dopo 24 h di incubazione di un inoculo fecale di gatto con una dieta di controllo a cui sono stati aggiunti diversi substrati prebiotici^{1,2}

| | CTRL | GA | CF | FOS | GOS | LAC | PEC | ANOVA <i>P</i> |
|---------------------------|------|------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|----------------|
| A. acetico, % | 47.3 | 47.0 | 48.5 | 34.7 ³ | 35.6 ³ | 29.9 ³ | 50.3 | <0.001 |
| A. propionico, % | 29.5 | 24.9 | 25.9 | 29.3 | 27.4 | 37.5 ³ | 26.3 | <0.001 |
| A. isobutirrico, % | 1.31 | 2.00 | 1.69 | 0.78 | 1.24 | 0.99 | 1.69 | 0.200 |
| A. <i>n</i> -butirrico, % | 20.2 | 24.7 | 21.5 | 33.3 ³ | 35.3 ³ | 30.2 ³ | 19.9 | <0.001 |
| A. isovalerico, % | 1.15 | 1.33 | 0.96 | 0.53 | 0.38 | 0.65 | 1.58 | 0.127 |
| A. <i>n</i> -valerico, % | 0.07 | 0.03 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.107 |
| AGV totali, mmol/L | 42.2 | 56.6 | 59.3 ³ | 56.2 | 38.4 | 52.0 | 53.2 | 0.005 |
| C2:C3 | 1.63 | 1.89 | 1.88 | 1.23 | 1.33 | 0.80 ³ | 1.97 | <0.001 |
| C2:+ <i>n</i> -C4:C3 | 2.32 | 2.89 | 2.73 | 2.40 | 2.65 | 1.61 ³ | 2.75 | 0.001 |

¹I valori si riferiscono alla media delle 5 bottiglie per trattamento

²CTRL = dieta di controllo; GA = acido gluconico; CF = fibra di carota; FOS = fruttooligosaccaridi; GOS = galattooligosaccaridi; LAC = lattitolo; PEC = pectine da agrumi; C2:C3 = rapporto acetato:propionato; C2+n-C4:C3 = rapporto acetato+n-butirrato:propionato.

³Significativamente diverso dal controllo ($P < 0.05$)

Tabella 5 - Conte delle popolazioni batteriche (log cellule/mL) dopo 24 h di incubazione di un inoculo fecale di gatto con una dieta di controllo a cui sono stati aggiunti diversi substrati prebiotici^{1,2}

| | CTRL | GA | CF | FOS | GOS | LAC | PEC | ANOVA <i>P</i> |
|-----------------------|------|------|-------------------|-------------------|------|------------------|-------------------|----------------|
| <i>6 h</i> | | | | | | | | |
| Enterobacteriaceae | 8.15 | 8.34 | 8.17 | 8.39 | 8.16 | 8.13 | 7.95 | 0.007 |
| <i>C. perfringens</i> | 6.63 | 6.47 | 8.16 ³ | 8.54 ³ | 6.33 | 7.10 | 8.19 ³ | <0.001 |
| <i>24 h</i> | | | | | | | | |
| Enterobacteriaceae | 9.19 | 9.29 | 9.30 | 9.37 | 9.16 | 8.9 ³ | 8.76 ³ | <0.001 |
| <i>C. perfringens</i> | 5.26 | 5.33 | 5.34 | 5.06 | 5.10 | 5.24 | 5.13 | 0.105 |

¹I valori si riferiscono alla media delle 5 bottiglie per trattamento

²CTRL = dieta di controllo; GA = acido gluconico; CF = fibra di carota; FOS = fruttooligosaccaridi; GOS = galattooligosaccaridi; LAC = lattitolo; PEC = pectine da agrumi

³Significativamente diverso dal controllo ($P < 0.05$)

Tabella 6 - Valori di pH e concentrazioni di ammoniaca (mmol/L) dopo 6 e 24 h di incubazione di un inoculo fecale di gatto con diete a diverso tenore proteico ed in presenza di diversi substrati prebiotici^{1,2}

| | CTRL LP | CTRL HP | LP + FOS | HP + FOS | LP + LAC | HP + LAC | ANOVA <i>P</i> | | |
|-----------------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|---------------------|----------|-----------------------|
| | | | | | | | Prebiotico | Proteina | Prebiotico x proteina |
| <i>6 h</i> | | | | | | | | | |
| pH | 6.73 | 6.93 | 6.75 | 6.95 | 6.75 | 6.94 | 0.875 | <0.001 | 0.977 |
| NH ₃ | 34.2 | 35.7 | 36.2 | 33.2 | 34.2 | 33.3 | 0.331 | 0.236 | 0.039 |
| <i>24 h</i> | | | | | | | | | |
| pH | 6.24 | 6.64 | 5.76 | 6.32 | 5.8 | 6.34 | <0.001 ³ | <0.001 | <0.001 |
| NH ₃ | 38.4 | 51.1 | 35.1 | 48.8 | 35.3 | 50.8 | 0.218 | <0.001 | 0.671 |

¹I valori si riferiscono alla media delle 5 bottiglie per trattamento

²CTRL = dieta di controllo; LP = bassa proteina; HP = alta proteina; FOS = fruttooligosaccaridi; LAC = lattitolo

³FOS e LAC significativamente differenti dal controllo ($P < 0.05$)

Tabella 7 - Concentrazioni delle amine biogene ($\mu\text{mol/L}$) dopo 6 e 24 h di incubazione di un inoculo fecale di gatto con diete a diverso tenore proteico ed in presenza di diversi substrati prebiotici^{1,2}

| | CTRL LP | CTRL HP | LP + FOS | HP + FOS | LP + LAC | HP + LAC | ANOVA <i>P</i> | | |
|-------------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|---------------------|----------|-----------------------|
| | | | | | | | Prebiotico | Proteina | Prebiotico x proteina |
| <i>6 h</i> | | | | | | | | | |
| Putrescina | 283 | 218 | 249 | 241 | 202 | 243 | 0.461 | 0.561 | 0.088 |
| Cadaverina | 201 | 201 | 172 | 222 | 167 | 222 | 0.915 | 0.013 | 0.162 |
| Spermidina | 44.5 | 59.4 | 33.8 | 99.6 | 37.3 | 59.4 | 0.456 | 0.012 | 0.206 |
| Spermina | 8.4 | 19.7 | 5.8 | 28.6 | 10.9 | 22.4 | 0.590 | <0.001 | 0.153 |
| <i>24 h</i> | | | | | | | | | |
| Putrescina | 672 | 939 | 1121 | 1370 | 952 | 964 | <0.001 ³ | 0.015 | 0.244 |
| Cadaverina | 184 | 230 | 180 | 254 | 195 | 176 | 0.328 | 0.059 | 0.094 |
| Spermidina | 38.4 | 58.4 | 27.6 | 54.0 | 45.4 | 51.5 | 0.090 | <0.001 | 0.040 |
| Spermina | 9.8 | 19.1 | 9.3 | 17.7 | 14.1 | 16.6 | 0.609 | <0.001 | 0.154 |

¹I valori si riferiscono alla media delle 5 bottiglie per trattamento.

²CTRL = dieta di controllo; LP = bassa proteina; HP = alta proteina; FOS = fruttooligosaccaridi; LAC = lattitolo

³FOS e LAC significativamente differenti dal controllo ($P < 0.05$).

Tabella 8 - Concentrazione totale di AGV (mmol/L) e relative proporzioni (%) dopo 24 h di incubazione di un inoculo fecale di gatto con diete a diverso tenore proteico ed in presenza di diversi substrati prebiotici^{1,2}

| | CTRL LP | CTRL HP | LP + FOS | HP + FOS | LP + LAC | HP + LAC | ANOVA <i>P</i> | | |
|---------------------------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|---------------------|----------|-----------------------|
| | | | | | | | Prebiotico | Proteina | Prebiotico x proteina |
| A. acetico, % | 50.1 | 44.2 | 44.1 | 37.9 | 33.9 | 33.4 | <0.001 ³ | <0.001 | 0.001 |
| A. propionico, % | 20.0 | 21.2 | 22.2 | 18.4 | 34.9 | 24.1 | <0.001 ⁴ | <0.001 | <0.001 |
| A. isobutirrico, % | 2.45 | 4.05 | 0.94 | 2.14 | 1.43 | 3.03 | <0.001 ⁵ | <0.001 | 0.122 |
| A. <i>n</i> -butirrico, % | 25.0 | 27.3 | 31.9 | 40.0 | 28.5 | 37.5 | <0.001 ⁶ | <0.001 | 0.003 |
| A. isovalerico, % | 2.23 | 3.19 | 0.88 | 1.57 | 1.23 | 1.99 | <0.001 ⁷ | <0.001 | 0.679 |
| AGV totali, mmol/L | 39.5 | 32.2 | 38.4 | 31.2 | 44.8 | 34.4 | 0.373 | 0.008 | 0.873 |
| C2:C3 | 2.51 | 2.09 | 1.99 | 2.08 | 0.97 | 1.46 | <0.001 ⁸ | 0.552 | <0.001 |
| C2:+ <i>n</i> -C4:C3 | 3.77 | 3.38 | 3.42 | 4.27 | 1.79 | 3.12 | <0.001 ⁹ | 0.002 | 0.002 |

¹I valori si riferiscono alla media delle 5 bottiglie per trattamento.

²CTRL = dieta di controllo; LP = bassa proteina; HP = alta proteina; FOS = fruttooligosaccaridi; LAC = lattitolo; C2:C3 = rapporto acetato:propionato; C2+*n*-C4:C3 = rapporto acetato+*n*-butirrato:propionato.

³FOS, LAC e CTRL significativamente differenti tra di loro ($P < 0.05$).

⁴LAC significativamente diverso da FOS e CTRL ($P < 0.05$).

⁵FOS, LAC e CTRL significativamente differenti tra di loro ($P < 0.05$).

⁶FOS, LAC e CTRL significativamente differenti tra di loro ($P < 0.05$).

⁷FOS, LAC e CTRL significativamente differenti tra di loro ($P < 0.05$).

⁸FOS, LAC e CTRL significativamente differenti tra di loro ($P < 0.05$).

⁹LAC significativamente diverso da FOS e CTRL ($P < 0.05$).

Tabella 9 - Conte delle popolazioni batteriche (log cellule/mL) dopo 6 e 24 h di incubazione di un inoculo fecale di gatto con diete a diverso tenore proteico ed in presenza di diversi substrati prebiotici^{1,2}

| | CTRL LP | CTRL HP | LP + FOS | HP + FOS | LP + LAC | HP + LAC | ANOVA <i>P</i> | | |
|---------------------------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|---------------------|----------|-----------------------|
| | | | | | | | Prebiotico | Proteina | Prebiotico x proteina |
| <i>6 h</i> | | | | | | | | | |
| Enterobacteriaceae | 8.33 | 8.52 | 8.43 | 8.48 | 8.49 | 8.48 | 0.604 | 0.160 | 0.284 |
| <i>C. perfringens</i> | 7.24 | 6.66 | 7.08 | 6.56 | 7.28 | 6.58 | 5.05 | <0.001 | 0.734 |
| <i>Lactobacillus</i> spp. | 4.58 | 4.34 | 4.50 | 4.42 | 4.86 | 4.29 | 0.483 | 0.003 | 0.092 |
| Enterococchi | 7.29 | 6.69 | 7.34 | 6.76 | 7.38 | 6.55 | 0.763 | <0.001 | 0.458 |
| <i>24 h</i> | | | | | | | | | |
| Enterobacteriaceae | 8.70 | 8.85 | 9.18 | 9.33 | 8.79 | 9.03 | <0.001 ³ | 0.057 | 0.898 |
| <i>C. perfringens</i> | 5.76 | 6.48 | 6.02 | 6.36 | 5.80 | 6.38 | 0.777 | <0.001 | 0.396 |
| <i>Lactobacillus</i> spp. | 4.22 | 3.51 | 4.20 | 4.07 | 4.23 | 3.60 | 0.213 | <0.001 | 0.154 |
| Enterococchi | 7.35 | 6.75 | 7.21 | 6.95 | 7.38 | 6.84 | 0.815 | <0.001 | 0.211 |

¹I valori si riferiscono alla media delle 5 bottiglie per trattamento.

²CTRL = dieta di controllo; LP = bassa proteina; HP = alta proteina; FOS = fruttooligosaccaridi; LAC = lattitolo

³Ivalori relativi alla presenza di FOS differiscono significativamente rispetto a CTRL e LAC ($P < 0.05$).

5.5 Discussione

Il presente studio è stato suddiviso in due parti.

La prima parte della sperimentazione si è proposta di indagare sugli effetti che diversi supplementi prebiotici hanno sul metabolismo del microbiota fecale del gatto. L'abbassamento del pH del lume intestinale è stato correlato alla riduzione di alcune popolazioni batteriche potenzialmente patogene e ad uno shift da ammoniacale ad ione ammonio, il quale non è assorbibile dalla mucosa enterica (McQuaid, 2005). La fermentazione dei carboidrati ad opera dei batteri intestinali è generalmente associata ad una aumentata produzione di acidi grassi volatili e lattato, il cui accumulo contribuisce alla riduzione del pH dell'ambiente enterico. Nel presente studio, rispetto al controllo tutti i substrati testati hanno ridotto il pH degli inoculi fecali; tuttavia, solo negli inoculi contenenti CF è stata riscontrata un'aumentata produzione di acidi grassi volatili al termine delle 24 h di fermentazione. Nonostante ciò, la presenza di alcuni oligosaccaridi ha avuto una netta influenza nel modificare i rapporti tra i diversi acidi grassi volatili. Dall'analisi dei composti volatili è risultato come la presenza di LAC riduca le concentrazioni di acetato e aumenti quelle di propionato e butirrato. Analogamente, la fermentazione di FOS e GOS ha indotto una diminuzione delle concentrazioni di acido acetico e un aumento di quelle di butirrato.

Contrariamente a ciò, in un lavoro di Biagi et al. (2013) è stato osservato come nel gatto adulto l'integrazione della dieta con GOS (10 g/kg di dieta) in combinazione con un ceppo di *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ha provocato un aumento delle concentrazioni fecali di acetato. Nello studio di Barry et al. (2010) l'inclusione di FOS nella dieta di gatti adulti (40 g/kg di dieta) ha determinato un incremento delle concentrazioni di acido acetico e acido *n*-butirrico. Analogamente, Kanakupt et al. (2011) hanno riportato aumentate concentrazioni di acetato e butirrato in gatti riceventi una combinazione di FOS e GOS (entrambi aggiunti in ragione di 5 g/kg di dieta). Un precedente studio (Hesta et al., 2001) ha invece evidenziato come il profilo fecale di acidi grassi volatili non abbia risentito dell'integrazione della dieta con FOS (30 g/kg di dieta).

Nonostante alcune discrepanze riscontrate in letteratura, appare evidente come l'integrazione della dieta con oligosaccaridi, nello specifico lattitolo e fruttooligosaccaridi, determini nel gatto un aumento delle concentrazioni in

intestino di *n*-butirrato, contribuendo al mantenimento della salute del tratto enterico. È stato infatti dimostrato come l'acido butirrico rappresenti la principale fonte di energia per le cellule della mucosa del tratto terminale dell'ileo (Chapman et al., 1995) e del grosso intestino (Roediger, 1980)

Mentre in nessuno degli studi precedentemente citati è stata riscontrata un'aumentata concentrazione fecale di propionato in gatti riceventi FOS, l'uso di fruttooligosaccaridi nell'alimentazione del cane sembra determinare un aumento delle concentrazioni di butirrato (Propst et al., 2003; Swanson et al., 2002a) e di propionato, sia *in vitro* (Biagi et al., 2010a) che *in vivo* (Flickinger et al., 2003a; Swanson et al., 2002b). I diversi rapporti tra acidi grassi volatili osservati negli studi condotti su cane e su gatto potrebbero essere attribuibili alla diversa composizione del microbiota intestinale delle due specie; inoltre, le diverse caratteristiche nutrizionali delle diete somministrate agli animali potrebbero influenzare il tipo e l'ammontare dei metaboliti esitanti dalle fermentazioni batteriche in intestino.

È stato osservato come le sostanze prebiotiche assunte con la dieta possano rappresentare una fonte energetica non trascurabile per il microbiota intestinale, contribuendo a limitare i fenomeni di proteolisi e il conseguente rilascio di cataboliti tossici quali ammoniaca e amine biogene (Russell et al., 1983).

L'uso di prebiotici (e antibiotici) rientra infatti tra le strategie adottate per ridurre l'ammoniaca originatasi dalle fermentazioni batteriche e che, una volta in circolo, potrebbe rivelarsi dannosa per pazienti affetti da insufficienza renale ed epatopatie, sia nell'uomo (Butterworth, 2003; Vogt e Frey, 1997) che nel cane (Howard et al., 2000). Qualora la disponibilità di energia sia adeguata, l'attività metabolica del microbiota intestinale è in grado di massimizzare la quantità di sostanze azotate convertite in proteina batterica ed escrete con le feci, limitandone l'assorbimento attraverso la mucosa enterica (Howard et al., 2000)

Nel gatto, la somministrazione di FOS (31 g/kg di dieta) ha indotto una maggiore escrezione fecale di azoto di origine batterica, quale diretta conseguenza dell'aumentata crescita microbica (Hesta et al., 2005). Nel presente studio, le concentrazioni di ammoniaca sono state ridotte significativamente da GOS a 6 h di incubazione e da GA, LAC e PEC al termine delle 24 h di fermentazione. Una tendenza ($P = 0.074$) da parte dei FOS a ridurre le concentrazioni di ammoniaca è stata osservata a 24 h. Contrariamente agli altri substrati aggiunti, le boccette di

fermentazione contenenti fibra di carota hanno mostrato una maggiore concentrazione di ammoniaca nel liquido di fermentazione.

Nel presente studio, la fermentazione di GOS, FOS e PEC ha dato origine ad un incremento delle concentrazioni di putrescina, catabolita di origine proteolitica.

L'assunzione di GOS da parte di gatti adulti (Biagi et al., 2013) è stata correlata ad una diminuzione delle concentrazioni fecali di ammoniaca senza tuttavia alterare le concentrazioni di amine biogene. Nel lavoro di Barry et al. (2010) gli Autori hanno osservato un aumento dei metaboliti di origine proteolitica (ammonica, acidi grassi ramificati, 4-metilfenolo, indolo, cadaverina, putrescina e triptamina) in gatti adulti riceventi FOS o pectine. Nel già citato studio di Kanakupt et al. (2011), l'integrazione della dieta di gatti adulti con FOS e/o GOS non ha avuto nessuna conseguenza sulle concentrazioni fecali di ammoniaca, 4-metilfenolo e indolo, mentre la combinazione di FOS e GOS ha incrementato le concentrazioni di acidi grassi a catena ramificata e di triptamina.

L'ordine Clostridiales è stato identificato come il più abbondante e rappresentativo del microbiota intestinale felino, probabilmente in virtù dell'adattamento delle popolazioni microbiche alla dieta carnivora del gatto (Ritchie et al., 2010). Lubbs et al. (2009) hanno osservato come la somministrazione di una dieta ad alto contenuto proteico determini nell'intestino del gatto un aumento delle popolazioni di *Clostridium* spp. e uno shift delle comunità batteriche con metabolismo prevalentemente proteolitico a spese dei batteri saccarolitici. Barry et al. (2010) hanno ipotizzato come in presenza di elevate concentrazioni di batteri proteolitici, l'integrazione nutrizionale con oligosaccaridi non sia sufficiente a stimolare l'attività di batteri a metabolismo saccarolitico quali lattobacilli e bifidobatteri, in misura tale da limitare per competizione le popolazioni proteolitiche intestinali.

In questo lavoro, al termine delle 6 h di incubazione, è stato osservato un aumento della popolazione di *C. perfringens* nei trattamenti riceventi CF, FOS e PEC, mentre le conte di lattobacilli e bifidobatteri non sono state influenzate dalla presenza di oligosaccaridi. Curiosamente, GOS, FOS e PEC hanno contribuito a ridurre le concentrazioni di ammoniaca ma, allo stesso tempo, hanno incrementato la concentrazione di putrescina. Queste osservazioni sono di difficile interpretazione, essendo i due metaboliti provenienti dall'attività proteolitica del microbiota intestinale. Secondo Spano et al. (2010), numerosi ceppi di batteri lattici, in condizioni di elevata acidità ambientale, sarebbero capaci di produrre

amine biogene attraverso reazioni di decarbossilazione di alcuni aminoacidi. La maggiore acidificazione che si verifica nel lume intestinale in seguito alla utilizzazione di substrati fermentescibili da parte dei batteri lattici potrebbe contribuire a inibire la flora batterica proteolitica e conseguentemente a ridurre le concentrazioni di ammoniaca; tuttavia, la concentrazione di amine biogene potrebbe aumentare, in conseguenza all'attivazione di specifici meccanismi di tolleranza dei batteri lattici ai bassi livelli di pH. Nel presente studio, la fermentazione di GA e LAC ha contribuito ad abbassare i valori di pH senza tuttavia determinare un incremento delle concentrazioni di putrescina negli inoculi fecali.

Tra le sostanze prebiotiche testate, solamente LAC e PEC hanno contribuito a ridurre le popolazioni di enterobatteriacee, mentre le conte di enterococchi, lattobacilli e bifidobatteri non sono state influenzate da nessun trattamento. Questi risultati sono in contrasto con quanto osservato da Barry et al. (2010), i quali hanno riportato un aumento delle conte fecali di *Lactobacillus* spp., *C. perfringens* ed *E. coli* conseguenti alla somministrazione nel gatto di pectine, mentre l'integrazione della dieta con FOS ha determinato un incremento delle popolazioni di *Bifidobacterium* spp. e una riduzione delle conte di *E. coli*. Nel lavoro di Kanakupt et al. (2011), sia FOS che GOS hanno contribuito ad aumentare le conte fecali di *Bifidobacterium* spp., senza tuttavia sortire effetti sulle popolazioni di *Lactobacillus* spp., *C. perfringens* ed *E. coli*. Contrariamente a quanto osservato da Kanakupt et al. (2011), in un precedente lavoro di Sparkes et al., (1998b), l'aggiunta di FOS alla dieta di gatti adulti ha determinato un aumento delle conte fecali di *Lactobacillus* spp. e *Bacteroides* spp. e una riduzione del numero di *E. coli* e *Clostridium* spp.

Sulla base dei risultati del primo esperimento, fruttooligosaccaridi e lattitolo sono stati selezionati per valutarne gli effetti sul microbiota intestinale del gatto in presenza di due differenti livelli proteici. Il lattitolo è stato selezionato in virtù della capacità di ridurre le popolazioni di enterobatteriacee e le concentrazioni di ammoniaca, senza incrementare le conte di *C. perfringens* e le concentrazioni di putrescina. Inoltre, il lattitolo è stato l'unico prebiotico capace di influenzare significativamente il rapporto acetato:propionato. Nel primo esperimento *in vitro*, la fermentazione di FOS, GOS e PEC ha dato luogo a risultati contraddittori; di conseguenza, la decisione di selezionare per il secondo studio *in vitro* i

fruttooligosaccaridi piuttosto che GOS e PEC è stata condizionata dal fatto che i FOS sono, oggigiorno, comunemente impiegati dall'industria del pet food quale supplemento prebiotico addizionato alle diete commerciali. Inoltre, l'acido gluconico è stato scartato in quanto ha avuto scarsa influenza sui parametri considerati nel presente lavoro, mentre la fibra di carota ha determinato un incremento delle concentrazioni di ammoniaca e delle conte di *C. perfringens* negli inoculi di fermentazione.

È stato osservato come la somministrazione di diete altamente proteiche (529 g PG/kg di SS) possano condizionare negativamente la composizione del microbiota intestinale del gatto, incrementando le conte fecali di *C. perfringens* e riducendo le popolazioni di bifidobatteri (Lubbs et al., 2009). Analoghi risultati sono stati osservati nello studio di Hooda et al. (2013) in gattini riceventi diete ad alto contenuto proteico (529 g PG/kg di SS).

L'impatto di una dieta secca estrusa (contenente, sulla SS, 329 g/kg di PG e 459 g/kg di estrattivi inazotati) e di una dieta umida (contenente, sulla SS, 419 g/kg di PG e 53 g/kg di estrattivi inazotati) sul microbiota intestinale del gatto adulto è stato studiato da Bermingham et al. (2013), i quali hanno riscontrato una maggiore prevalenza delle popolazioni di *Lactobacillus* spp. e una minore abbondanza di *Bacteroides* spp. nei gatti riceventi la dieta estrusa rispetto ai gatti riceventi la dieta umida.

Nel presente lavoro, la dieta CTRL-HP è stata ottenuta mescolando una farina di bovino e suino scarsamente digeribile con la dieta CTRL-LP. Poiché si è voluto simulare *in vitro* il differente ammontare di nutrienti indigesti che potrebbero raggiungere il colon del gatto quando questo è alimentato con diete a diversa digeribilità, le bottiglie dei trattamenti LP e HP hanno contenuto un diverso quantitativo di residuo indigerito. Riguardo i trattamenti LP, ciascuna bottiglia conteneva 54 mg di PG e 22 mg di amido, mentre le bottiglie relative ai trattamenti HP contenevano 368 mg di PG e 11 mg di amido.

Al termine delle 24 h di incubazione, i valori di pH degli inoculi fecali sono stati modificati sia dalla presenza dei prebiotici che dal diverso livello proteico. Secondo le aspettative, siano FOS che LAC hanno contribuito ad aumentare l'acidità degli inoculi, mentre le bottiglie contenenti le diete CTRL-HP hanno mostrato valori di pH più elevati. L'aumento del pH negli inoculi fecali potrebbe essere una diretta conseguenza dell'incremento di ammoniaca riscontrato nei

trattamenti HP. Contrariamente a quanto osservato nel primo studio, la presenza di LAC e FOS non ha determinato nessuna riduzione delle concentrazioni di ammoniaca. In uno studio condotto su Beagle riceventi una dieta ricca di proteine scarsamente digeribili, la somministrazione di FOS (30 g/kg di dieta) non ha contribuito a ridurre la concentrazione fecale di ammoniaca (Hesta et al., 2003). Tra gli altri cataboliti di origine proteolitica, anche la concentrazione di amine biogene è risultata più elevata nei trattamenti HP. A conferma di quanto osservato precedentemente, anche nel secondo studio i FOS hanno determinato un aumento delle concentrazioni di putrescina.

La concentrazione di acidi grassi a catena ramificata è stata influenzata sia dal livello proteico che dalla presenza di oligosaccaridi. Mentre le diete ad alta proteina ne hanno determinato un incremento, LAC e soprattutto FOS hanno contribuito a ridurre le concentrazioni di acidi grassi a catena ramificata.

Dopo 24 h di fermentazione, negli inoculi fecali relativi alle diete CTRL-HP è stato riscontrato un aumento delle popolazioni di *C. perfringens* e una riduzione delle conte di *Lactobacillus* spp. ed enterococchi; inoltre, è stata osservata una tendenza all'aumento delle popolazioni di enterobatteriacee. A conferma di quanto riportato da altri Autori (Birmingham et al., 2013; Hooda et al., 2013; Lubbs et al., 2009), i risultati osservati nel presente studio mostrano come la maggior disponibilità di proteina indigerita che raggiunge il grosso intestino conseguentemente al consumo di diete altamente proteiche e scarsamente digeribili, possa determinare un incremento dell'attività proteolitica della flora batterica e delle concentrazioni di cataboliti tossici, contribuendo alla creazione di un habitat intestinale favorevole alle specie batteriche indesiderate a scapito di quelle considerate virtuose.

Sulla base dei presenti risultati, l'efficacia dei supplementi prebiotici nel ridurre l'attività proteolitica sembra limitata quando la matrice proteica appare, rispetto ai carboidrati, come il substrato maggiormente disponibile per le attività metaboliche della flora microbica. Lattitolo e FOS non hanno avuto alcun effetto sulle concentrazioni di AGV totali, mentre negli inoculi contenenti le diete CTRL-HP è stata osservata una riduzione degli acidi grassi volatili totali e delle conte di batteri lattici. A conferma di quanto già osservato nel primo studio in vitro, il lattitolo ha ridotto significativamente il rapporto acetato:propionato e il rapporto acetato+butirrato:propionato. Gli effetti che le sostanze prebiotiche sortiscono sul microbiota intestinale del gatto sembrano essere condizionati dalla disponibilità di

proteina indigerita; infatti, il lattitolo ha determinato un aumentato rapporto di acido propionico nelle bottiglie contenenti la dieta LP e una maggiore proporzione di *n*-butirrico nei trattamenti CTRL-HP. I fruttoligosaccaridi, contrariamente, hanno determinato un incremento delle percentuali di acido *n*-butirrico, senza tuttavia esercitare alcun effetto sulle concentrazioni di acido propionico, sia negli inoculi fecali contenenti la dieta LP che quelle CTRL-HP.

Dai presenti risultati si evince come la fermentazione di diversi oligosaccaridi susciti diversi effetti sulla composizione ed attività del microbiota intestinale del gatto, e come questi effetti possano essere condizionati dall'abbondanza di proteine indigerite nel grosso intestino. Inoltre, questo studio ha evidenziato come l'inclusione di fonti proteiche scarsamente digeribili nella dieta del gatto possa esercitare effetti negativi sulla salute dell'ambiente enterico, incrementando il numero delle popolazioni batteriche indesiderate e favorendo l'attività proteolitica della flora batterica intestinale dell'animale.

6 Valutazione degli effetti sulla microflora intestinale del cane di diete addizionate di fruttooligosaccaridi e differenti per qualità e quantità della frazione proteica. Impiego di un modello *in vitro*

6.1 Materiali e metodi

Un gruppo di 12 cani adulti e in buono stato di salute, di età compresa tra 1 e 6 anni e di peso corporeo medio 17 kg è stato alimentato per 4 settimane con una dieta secca estrusa per cani adulti, contenente fruttooligosaccaridi (15 g/kg di dieta) e formulata mediante l'impiego dei seguenti ingredienti: cereali, carni e sottoprodotti delle carni, oli e grassi, estratti di proteine vegetali, minerali e lieviti (EffeEffe S.p.A., Pieve di Porto Morone, Italia).

Tre diete secche sperimentali per cani adulti (dieta 1, bassa proteina e alta digeribilità (LP HD); dieta 2, alta proteina e alta digeribilità (HP HD); dieta 3, alta proteina e bassa digeribilità (HP LD)) sono state sottoposte a digestione *in vitro* secondo la metodica descritta da Vervaeke et al. (1989) e modificata secondo quanto proposto da Biagi et al. (2010a). Successivamente alla fase di digestione *in vitro*, i residui indigeriti di ciascuna dieta sono stati posti in stufa alla temperatura di 65 °C sino al raggiungimento del peso costante, per essere successivamente impiegati nella prova di fermentazione *in vitro*. La composizione chimica delle diete e delle rispettive frazioni indigerite è riportata in tabella 10. Le diete ad alto contenuto proteico sono state ottenute impiegando nella loro formulazione una farina di cicciolo suino altamente digeribile (digeribilità totale 71.2%) per la dieta HP HD, e una farina di carne di bovino e suino (digeribilità totale 31.4%) per la dieta HP LD.

L'inoculo fecale impiegato per la fermentazione *in vitro* è stato ottenuto da ciascun cane prelevando i campioni di feci immediatamente dopo l'escrezione, mescolandoli tra loro e diluendoli 1:10 p/v in Wilkins Chalgren Anaerobe Broth (WCAB 0.5x; Oxoid, Basingstoke, UK). L'inoculo fecale così ottenuto è stato ulteriormente diluito in terreno di arricchimento (33 ml/L), secondo quanto proposto da Sunvold et al. (1995b; tabella 1) e dispensato in 5 boccette da 30 mL

per ciascun trattamento. Sei trattamenti sono stati allestiti: 1) LP HD; 2) HP HD; 3) HP LD; 4) LP HD+FOS; 5) HP HD+FOS; 6) HP HD+FOS. Ciascuna bottiglia conteneva il residuo indigerito di una delle tre diete, aggiunto in ragione di 10 g/L, mentre i fruttooligosaccaridi sono stati addizionati alla concentrazione finale di 1.5 g/L. Il pH degli inoculi fecali è stato regolato a 6.7; le bottiglie sono state quindi sigillate ermeticamente e poste a incubare in atmosfera controllata (85% N₂, 10% CO₂ e 5% H₂) per 24 h a 39 °C all'interno di una camera anaerobica (Anaerobic System; Forma Scientific Co., Marietta, OH, USA). Campioni di liquido di fermentazione sono stati raccolti da ciascuna bottiglia a 6 e 24 h, immediatamente congelati a -80 °C e destinati alle successive analisi per la determinazione del pH, dell'ammoniaca, delle amine biogene e per la conta delle popolazioni batteriche. I campioni raccolti a 24 h sono stati destinati anche all'analisi gascromatografica per la determinazione degli acidi grassi volatili.

Tabella 10 - Composizione chimica delle diete e delle relative frazioni indigerite¹

| | % sulla S.S. | | | | | |
|----------------------------|--------------|-----------------|---------------|---------------|--------------|-------|
| | S.S., % | Proteina grezza | Grassi grezzi | Ceneri grezze | Fibra grezza | Amido |
| <i>Diete sperimentali</i> | | | | | | |
| LP HD | 92.9 | 22.9 | 12.0 | 6.60 | 1.51 | 46.4 |
| HP HD | 93.5 | 30.4 | 14.0 | 8.20 | 1.60 | 36.4 |
| HP LD | 93.8 | 30.6 | 12.4 | 12.3 | 1.39 | 33.8 |
| <i>Frazioni indigerite</i> | | | | | | |
| LP HD | - | 13.5 | 2.24 | 28.1 | - | 5.80 |
| HP HD | - | 31.1 | 4.60 | 30.2 | - | 1.40 |
| HP LD | - | 21.2 | 2.44 | 33.9 | - | - |

¹LP HD = bassa proteina, alta digeribilità; HP HD = alta proteina, alta digeribilità; HP LD = alta proteina, bassa digeribilità.

6.2 Analisi chimiche e microbiologiche dei campioni

Le analisi sulla dieta secca estrusa, sulla farina di carne e sulle frazioni indigerite delle diete sono state condotte seguendo le metodiche standard AOAC (AOAC, 2000; Metodo 954.01 per la proteina grezza, Metodo 920.39 per i lipidi grezzi, Metodo 920.40 per l'amido, Metodo 942.05 per le ceneri grezze). L'ammoniaca è stata determinata mediante l'impiego di un apposito kit commerciale (Urea/BUN-Color, BioSystem S.A., Barcellona, Spagna). Gli acidi grassi volatili sono stati determinati mediante gascromatografia, secondo la metodica descritta da Biagi et al. (2006). Per la determinazione delle amine biogene, i campioni sono stati preliminarmente diluiti 1:5 (v/v) in acido perclorico 0.3 M (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); successivamente, le amine biogene sono state separate mediante HPLC e quantificate tramite fluorimetria, secondo quanto descritto da Stefanelli et al. (1986).

Le popolazioni batteriche sono state determinate tramite ibridazione fluorescente *in situ* (FISH), utilizzando kit commerciali specifici (Ribo Technologies, Groeningen, Paesi Bassi) per la conta di enterococchi, Enterobacteriaceae, *Clostridium perfringens*, *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp.

La lettura dei vetrini è stata effettuata mediante un microscopio ad epifluorescenza Nikon Eclipse E-600 (Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Paesi Bassi), equipaggiato con un filtro specifico per osservare la fluorescenza del FITC.

6.3 Analisi statistica

I dati sono stati analizzati tramite ANOVA a tre vie, con il tenore proteico, la digeribilità proteica e la presenza di FOS come effetti principali; ciascuna bottiglia ha rappresentato una singola unità sperimentale. Le differenze sono state ritenute significative per $P < 0.05$. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite mediante il software Statistica 10.0 (Stat Soft Italia, Padova, Italia).

6.4 Risultati

I valori di pH e le concentrazioni di ammoniaca a 6 e 24 h di fermentazione sono mostrati in tabella 11. Dopo 6 h di incubazione, il pH è stato influenzato ($P < 0.001$) sia dal livello proteico (6.26 vs. 6.61 per LP e HP, rispettivamente) che dalla

digeribilità proteica (6.38 vs. 6.71 per HD e LD, rispettivamente), mentre è stato ridotto dai FOS (6.23 vs. 6.75). Al termine delle 24 h di fermentazione sono stati osservati valori più bassi di pH negli inoculi contenenti i trattamenti LD (5.98 vs. 6.30), HD (6.09 vs. 6.40) e FOS (5.96 vs. 6.44). Dopo 6 h di fermentazione, i valori di ammoniaca negli inoculi fecali sono stati ridotti ($P = 0.002$) dalla presenza di FOS (34.6 vs. 37.0 mmol/L). Al termine delle 24 di incubazione, la concentrazioni di ammoniaca sono state ridotte dalla presenza di FOS (36.4 vs. 40.3 mmol/L; $P < 0.001$) e incrementate dai trattamenti HD (38.9 vs. 37.4 mmol; $P = 0.002$) e HP (50.2 vs. 36.2 mmol/L; $P < 0.05$).

Le concentrazioni degli acidi grassi volatili e i rapporti tra gli stessi sono esposti in tabella 12. Dopo 24 h di fermentazione, la presenza di FOS ha determinato un incremento della concentrazione totale di AGV negli inoculi fecali (+14.2 mmol/L; $P < 0.001$), un decremento della percentuale di acetato (57.1 vs. 73.8%) e un aumento della presenza di propionato (20.9 vs. 16.4%) e acido *n*-butirrico (21.0 vs. 7.5%). Gli inoculi contenenti le diete a bassa digeribilità hanno mostrato ($P < 0.001$) la più bassa concentrazione di AGV totali (31.5 vs. 44.0 mmol/L) e il più basso rapporto percentuale di acido propionico (15.3 vs. 21.8%). Una riduzione di quest'ultimo parametro è stata osservata anche nelle bottiglie contenenti le diete HD (17.4 vs. 21.8%; $P < 0.05$). Il rapporto acetato:propionato e il rapporto acetato + *n*-butirrato:propionato sono stati ridotti ($P < 0.001$) dalla presenza di FOS e incrementati nelle bottiglie contenenti le diete LD ($P < 0.01$). La fermentazione dei FOS ha indotto una riduzione dei rapporti percentuali di acido isovalerico (0.5 vs. 1.4%; $P = 0.035$).

Riguardo la presenza delle amine biogene (tabella 13), la concentrazione di spermina dopo 6 h di incubazione è stata influenzata dal livello proteico (39.0 vs. 32.3 $\mu\text{mol/mL}$ per LP e HP, rispettivamente; $P < 0.001$), mentre un incremento delle concentrazioni di putrescina a 6 e 24 h sono state osservate nelle bottiglie contenenti le diete a bassa digeribilità (+21 e +22%, rispettivamente; $P < 0.05$) e in quelle contenenti FOS (+18 e +24%, rispettivamente; $P < 0.01$). Al termine delle 24 h di fermentazione è stata osservata una maggiore concentrazione di spermidina nelle bottiglie contenenti le diete a bassa digeribilità (97.8 vs. 71.4 $\mu\text{mol/mL}$; $P < 0.001$), mentre la presenza di FOS ha indotto un incremento delle concentrazioni di spermina (19.8 vs. 9.7 $\mu\text{mol/mL}$; $P < 0.001$). Le concentrazioni di cadaverina non sono state influenzate da nessun trattamento.

Le conte relative alle popolazioni batteriche sono riportate in tabella 14.

A 6 h di incubazione, le diete HP hanno indotto una riduzione delle popolazioni di *C. perfringens* (5.90 vs. 6.71 log cellule/mL; $P < 0.05$), *Lactobacillus* spp. (3.46 vs. 4.42 log cellule/mL; $P < 0.001$) ed enterococchi (7.71 vs. 8.52 log cellule/mL; $P = 0.026$). Dopo 24 h di fermentazione, è stata osservata una riduzione ($P < 0.05$) delle conte di *Lactobacillus* spp. (3.2 vs. 3.7 log cellule/mL) e delle conte di enterococchi (7.5 vs. 8.2 log cellule/mL) negli inoculi contenenti le diete HP, mentre le diete LD hanno mostrato una tendenza ad incrementare la popolazione di *C. perfringens* (6.0 vs. 5.8 log cellule/mL; $P = 0.07$); la fermentazione dei fruttooligosaccaridi ha determinato un incremento delle popolazioni di enterobatteriacee (8.6 vs. 8.2 log cellule/mL; $P < 0.001$) e una riduzione delle conte di *Lactobacillus* spp. (3.1 vs. 3.6 log cellule/mL; $P < 0.001$). Le popolazioni di bifidobatteri (6.72 e 6.85 log cellule/mL a 6 e 24 h, rispettivamente) non sono state influenzate da nessun trattamento.

Tabella 11 - Valori di pH e concentrazioni di ammoniaca (mmol/L) dopo 6 e 24 h di incubazione di un inoculo fecale di cane con diete differenti per tenore proteico e digeribilità, in presenza di fruttooligosaccaridi^{1,2}

| | LP HD | HP HD | HP LD | LP HD + FOS | HP HD + FOS | HP LD + FOS | ANOVA P | | |
|-----------------|-------|-------|-------|----------------|----------------|----------------|---------------------|--------------|---------|
| | | | | | | | Livello proteico | Digeribilità | FOS |
| <i>6 h</i> | | | | | | | | | |
| pH | 6.60 | 6.76 | 6.90 | 5.93 | 6.24 | 6.52 | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 |
| NH ₃ | 37.3 | 37.8 | 36.0 | 33.6 | 35.2 | 35.1 | 0.238 | 0.281 | 0.002 |
| <i>24 h</i> | | | | | | | | | |
| pH | 6.23 | 6.41 | 6.67 | 5.74 | 5.99 | 6.14 | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 |
| NH ₃ | 40.3 | 41.6 | 39.2 | 36.0 | 37.8 | 35.6 | 0.023 | 0.002 | < 0.001 |

¹I valori si riferiscono alla media delle 5 bottiglie per trattamento.

²LP HD = bassa proteina, alta digeribilità; HP HD = alta proteina, alta digeribilità; HP LD = alta proteina, bassa digeribilità; FOS = fruttooligosaccaridi.

Tabella 12- Concentrazione totale di AGV (mmol/L) e relative proporzioni (%) dopo 24 h di incubazione di un inoculo fecale di cane con diete differenti per tenore proteico e digeribilità, in presenza di fruttooligosaccaridi^{1,2}

| | LP HD | HP HD | HP LD | LP HD + FOS | HP HD + FOS | HP LD + FOS | ANOVA P | | |
|--------------------|-------|-------|-------|----------------|----------------|----------------|------------------|--------------|---------|
| | | | | | | | Livello proteico | Digeribilità | FOS |
| A. acetico, % | 73.0 | 68.3 | 84.0 | 55.7 | 62.9 | 53.3 | 0.880 | 0.592 | < 0.001 |
| A. propionico, % | 20.2 | 18.0 | 8.80 | 23.9 | 20.6 | 19.3 | 0.032 | < 0.001 | < 0.001 |
| A. isobutirrico, % | 0.22 | 1.40 | 0.78 | 0.54 | 0.20 | 0.66 | 0.105 | 0.779 | 0.123 |
| A. n-butirrico, % | 5.42 | 10.3 | 5.47 | 19.1 | 16.0 | 26.2 | 0.598 | 0.219 | < 0.001 |
| A. isovalerico, % | 1.12 | 1.96 | 0.99 | 0.89 | 0.23 | 0.53 | 0.698 | 0.476 | 0.035 |
| AGV totali, mmol/L | 37.7 | 35.5 | 22.3 | 50.6 | 52.3 | 40.8 | 0.864 | < 0.001 | < 0.001 |
| C2:C3 | 3.65 | 3.81 | 9.61 | 2.35 | 3.07 | 2.77 | 0.585 | 0.005 | < 0.001 |
| C2:+n-C4:C3 | 3.91 | 4.40 | 10.2 | 3.14 | 3.86 | 4.13 | 0.409 | 0.001 | < 0.001 |

¹I valori si riferiscono alla media delle 5 bottiglie per trattamento.

²LP HD = bassa proteina, alta digeribilità; HP HD = alta proteina, alta digeribilità; HP LD = alta proteina, bassa digeribilità; FOS = fruttooligosaccaridi.

Tabella 13 - Concentrazione delle amine biogene ($\mu\text{mol/L}$) dopo 6 e 24 h di incubazione di un inoculo fecale di cane con diete differenti per tenore proteico e digeribilità, in presenza di fruttooligosaccaridi^{1,2}

| | LP HD | HP HD | HP LD | LP HD + FOS | HP HD + FOS | HP LD + FOS | ANOVA <i>P</i> | | |
|-------------|-------|-------|-------|----------------|----------------|----------------|---------------------|--------------|---------|
| | | | | | | | Livello proteico | Digeribilità | FOS |
| <i>6 h</i> | | | | | | | | | |
| Putrescina | 443 | 542 | 601 | 591 | 577 | 705 | 0.241 | 0.013 | 0.003 |
| Cadaverina | 18.6 | 25.8 | 19.0 | 23.3 | 12.9 | 22.5 | 0.413 | 0.631 | 0.133 |
| Spermidina | 63.2 | 68.8 | 65.0 | 68.3 | 66.4 | 59.4 | 0.839 | 0.519 | 0.133 |
| Spermina | 40.3 | 34.5 | 35.6 | 41.2 | 28.6 | 29.0 | < 0.001 | 0.422 | 0.080 |
| <i>24 h</i> | | | | | | | | | |
| Putrescina | 550 | 617 | 790 | 780 | 775 | 863 | 0.514 | 0.013 | < 0.001 |
| Cadaverina | 31.1 | 20.9 | 20.3 | 24.2 | 24.5 | 22.3 | 0.734 | 0.220 | 0.720 |
| Spermidina | 105.4 | 65.6 | 67.5 | 94.0 | 82.6 | 66.0 | 0.002 | 0.128 | 0.769 |
| Spermina | 11.9 | 5.8 | 11.6 | 25.8 | 20.6 | 17.1 | 0.055 | 0.519 | < 0.001 |

¹I valori si riferiscono alla media delle 5 bottiglie per trattamento.

²LP HD = bassa proteina, alta digeribilità; HP HD = alta proteina, alta digeribilità; HP LD = alta proteina, bassa digeribilità; FOS = fruttooligosaccaridi.

Tabella 14 - Conte delle popolazioni batteriche (log cellule/mL) dopo 6 e 24 h di incubazione di un inoculo fecale di cane con diete differenti per tenore proteico e digeribilità, in presenza di fruttooligosaccaridi^{1,2}

| | LP HD | HP HD | HP LD | LP HD + FOS | HP HD + FOS | HP LD + FOS | ANOVA P | | |
|---------------------------|-------|-------|-------|----------------|----------------|----------------|------------------|--------------|---------|
| | | | | | | | Livello proteico | Digeribilità | FOS |
| <i>6 h</i> | | | | | | | | | |
| Enterobacteriaceae | 8.60 | 7.59 | 8.60 | 8.70 | 8.90 | 8.81 | 0.404 | 0.345 | 0.177 |
| <i>C. perfringens</i> | 6.74 | 5.20 | 6.59 | 6.68 | 5.93 | 5.89 | 0.049 | 0.231 | 0.976 |
| <i>Lactobacillus</i> spp. | 4.31 | 3.60 | 3.41 | 4.53 | 3.45 | 3.37 | < 0.001 | 0.303 | 0.929 |
| Enterococchi | 8.54 | 7.20 | 7.80 | 8.50 | 7.81 | 8.13 | 0.026 | 0.297 | 0.405 |
| <i>24 h</i> | | | | | | | | | |
| Enterobacteriaceae | 8.31 | 8.43 | 7.94 | 8.69 | 8.51 | 8.69 | 0.746 | 0.097 | < 0.001 |
| <i>C. perfringens</i> | 5.83 | 5.79 | 5.98 | 5.81 | 5.88 | 6.08 | 0.918 | 0.068 | 0.499 |
| <i>Lactobacillus</i> spp. | 4.20 | 3.34 | 3.16 | 3.16 | 3.00 | 3.12 | 0.002 | 0.836 | < 0.001 |
| Enterococchi | 8.04 | 7.86 | 7.69 | 8.30 | 6.72 | 7.66 | 0.040 | 0.349 | 0.371 |

¹I valori si riferiscono alla media delle 5 bottiglie per trattamento.

²LP HD = bassa proteina, alta digeribilità; HP HD = alta proteina, alta digeribilità; HP LD = alta proteina, bassa digeribilità; FOS = fruttooligosaccaridi.

6.5 Discussione

La riduzione dei livelli di pH dell'ambiente enterico è considerata un evento positivo in quanto, come precedentemente osservato, contribuisce a contrastare lo sviluppo di specie batteriche potenzialmente patogene (Gibson et al., 2007); inoltre, un basso livello di pH induce uno shift da ammoniaca ad ione ammonio, limitandone l'assorbimento attraverso la parete intestinale (McQuaid, 2005). Nel presente studio, il pH degli inoculi fecali è stato ridotto dalla presenza di fruttooligosaccaridi, mentre i trattamenti HP ed LD hanno indotto un aumento dei valori di pH. È noto come la fermentazione dei carboidrati esiti nella produzione di metaboliti quali l'acido lattico e acidi grassi volatili, i quali contribuiscono a ridurre il pH del contenuto luminale in intestino. Anche nel presente studio è stato osservato un incremento della concentrazione di AGV totali nei liquidi di fermentazione contenenti FOS. La riduzione del pH negli inoculi fecali in seguito alla fermentazione dei fruttooligosaccaridi è stata osservata anche in un lavoro *in vitro* di Biagi et al. (2010a) ma non nello studio sul gatto precedentemente esposto nella presente dissertazione (Pinna et al., 2014). Anche in numerosi lavori *in vivo* riguardanti il cane, la somministrazione di FOS non ha indotto nessuna riduzione del pH fecale (Flickinger et al., 2003b; Hesta et al., 2003; Middelbos et al., 2007; Swanson et al., 2002a). Le concentrazioni di AGV che si riscontrano nei fluidi intestinali variano lungo i diversi tratti enterici poiché questi metaboliti vengono rapidamente assorbiti dalla mucosa intestinale (Stevens e Hume, 1998): infatti, secondo Topping e Clifton (2001), di tutti gli acidi grassi volatili derivanti dalle fermentazioni batteriche in intestino solamente il 5% può essere determinato nelle feci. Questa considerazione può spiegare le discrepanze tra i valori di pH e le concentrazioni di AGV spesso osservate tra diversi lavori scientifici. La fermentazione dei diversi trattamenti ha avuto influenza sui rapporti tra acidi grassi volatili: la presenza di FOS non solo ha incrementato la concentrazione di AGV totali ma ha anche determinato una riduzione dell'acetato e un aumento della presenza di propionato e acido *n*-butirrico. La presenza di elevate concentrazioni di butirrato è considerata positiva, in quanto questo acido organico funge da fonte energetica preferenziale per i colonociti, contribuendo al mantenimento del buono stato di salute della mucosa intestinale (Chapman et al., 1995; Roediger, 1980). A conferma di quanto osservato in questo studio, anche altri Autori hanno rilevato

come l'inclusione di FOS in diete per cani adulti abbia determinato un aumento delle concentrazioni fecali di AGV totali (Twomey et al., 2003), *n*-butirrato (Propst et al., 2003; Swanson et al., 2002a) e acido propionico, sia *in vitro* (Biagi et al., 2010a) che *in vivo* (Flickinger et al., 2003a; Swanson et al., 2002c). Negli inoculi contenenti le diete LD è stata osservata una riduzione della presenza di AGV, mentre nessuna influenza hanno avuto i trattamenti HP; questo dato suggerisce come il microbiota intestinale del cane possa essere maggiormente influenzato dalla digeribilità della matrice proteica piuttosto che da un elevato contenuto in proteine della dieta. In un recente studio condotto su cani adulti (Hang et al., 2013), la somministrazione di una dieta ad alto contenuto proteico (609 g di PG per kg di dieta) ha determinato una riduzione delle concentrazioni fecali di acetato, propionato ed acidi grassi volatili a catena ramificata rispetto alla dieta di controllo a moderato contenuto in proteina (264 g di PG per kg di dieta). Nel presente studio, sia le diete a bassa digeribilità che quelle ad alto contenuto proteico hanno determinato una riduzione dell'acido propionico, senza tuttavia alterare i rapporti di acetato. Inoltre, come precedentemente menzionato, entrambi i trattamenti HP e LD hanno determinato un incremento dei valori di pH nei liquidi di fermentazione. Questo fenomeno potrebbe essere attribuibile all'aumento della presenza di ammoniaca al termine delle 24 h di fermentazione nelle bottiglie contenenti le diete HP e HD. Elevate concentrazioni fecali di ammoniaca sono state osservate da svariati Autori in cani riceventi diete ad alto contenuto proteico (Hang et al., 2013; Hesta et al., 2003; Zentek et al., 2004, 2003). Aumentati livelli di ammoniaca sono stati osservati anche da Nery et al. (2012) nelle feci di cani a cui è stata somministrata una dieta ricca in farina di pollo scarsamente digeribile rispetto ai soggetti riceventi una dieta altamente digeribile composta prevalentemente da glutine di frumento come fonte proteica; nello stesso studio, rispetto ad una dieta a basso contenuto in proteina (220 g di PG per kg di dieta), sono state rilevate aumentate concentrazioni fecali di ammoniaca in cani alimentati con una dieta altamente proteica (390 g di PG per kg di dieta). Analogamente, Hesta et al. (2003) hanno rilevato aumentate concentrazioni di ammoniaca nelle feci di soggetti a cui è stata somministrata una dieta costituita principalmente da una farina di carne e ossa scarsamente digeribile rispetto a cani riceventi una dieta contenente farina di pollame. Notoriamente, la farina di pollo è considerata una tra le fonti proteiche maggiormente digeribili impiegate nella

formulazione del pet food, mentre le farine di carne ed ossa sono ritenute fonti proteiche economiche e a bassa digeribilità (Murray et al., 1997; Yamka et al., 2003). L'ammoniaca è un composto tossico dai potenziali effetti cancerogeni (Lin e Visek, 1991), noto per esercitare effetti negativi sulla funzionalità epatica e renale (Butterworth, 2003; Howard et al., 2000; Vogt e Frey, 1997) e sul corretto sviluppo dei villi intestinali (Nousiainen, 1991). In questo lavoro, le concentrazioni di ammoniaca sono state ridotte dalla presenza di FOS, sia a 6 che a 24 h di incubazione. Contrariamente a ciò, in due precedenti studi *in vitro* sul cane (Biagi et al., 2010a) e sul gatto (Pinna et al., 2014), la fermentazione di fruttooligosaccaridi non ha avuto alcun effetto sulla riduzione delle concentrazioni di ammoniaca negli inoculi fecali. L'integrazione di diete per cani adulti con fruttooligosaccaridi ha dato origine a risultati discordanti: Flickinger et al. (2003a) hanno riportato come la somministrazione di FOS possa esercitare effetti positivi sulla salute intestinale del cane riducendo le concentrazioni fecali di ammoniaca, mentre altri Autori non hanno osservato nessun effetto positivo dei FOS sui livelli fecali di ammoniaca (Barry et al., 2009; Beynen et al., 2002; Hesta et al., 2003; Strickling et al., 2000; Swanson et al., 2002a). I risultati riportati dai diversi studi fanno ipotizzare come gli effetti che i fruttooligosaccaridi esercitano sulle concentrazioni di ammoniaca nelle feci siano influenzati da numerosi fattori, tra cui la percentuale di inclusione di FOS nella dieta o la composizione della dieta stessa. Inoltre, analogamente per quanto si verifica con gli acidi grassi volatili, è noto come l'ammoniaca sia rapidamente assorbita attraverso la mucosa intestinale e come le concentrazioni fecali di tale catabolita non rispecchino quelle che si potrebbero riscontrare nel contenuto luminale intestinale.

Mentre gli acidi grassi volatili derivano dalla fermentazione di proteine e carboidrati, gli acidi grassi a catena ramificata esitano esclusivamente dal metabolismo batterico degli aminoacidi ramificati (Nordgaard et al., 1995; Rasmussen et al., 1988; Smith e Macfarlane, 1997a). È stato osservato da diversi Autori come la presenza e la tipologia dei cataboliti derivanti dalle reazioni di proteolisi in intestino siano condizionati sia dal contenuto che dalla fonte proteica della dieta, nell'uomo (Macfarlane et al., 1992), nel cane (Hang et al., 2013; Kuzmuk et al., 2005; Nery et al., 2012) e nei carnivori stretti (Depauw et al., 2012). Tuttavia, nell'attuale lavoro i rapporti di acido isobutirrico e isovalerico non sono stati influenzati né dalla presenza di un alto livello proteico, né dalle diete a bassa

digeribilità. Al contrario, la presenza di FOS ha indotto una riduzione delle concentrazioni di acido isovalerico, analogamente a quanto riportato da Depauw et al. (2012), i quali hanno osservato una riduzione della concentrazione di acidi grassi a catena ramificata in inoculi fecali di ghepardo fermentanti FOS.

Le amine biogene sono composti putrefattivi derivati da reazioni di decarbossilazione di aminoacidi e peptidi (Scott et al., 2013). In questo lavoro, la fermentazione di fruttooligosaccaridi ha promosso un aumento delle concentrazioni di spermina e putrescina. Questo fenomeno sembra essere in contraddizione con la capacità dei FOS di ridurre l'ammontare degli altri composti di origine proteolitica quali ammoniaca e acido isovalerico; tuttavia, anche nel precedente lavoro esposto nella presente dissertazione è stato osservato come la fermentazione di FOS, pectine e galattooligosaccaridi abbia favorito un aumento delle concentrazioni di putrescina. Analogamente, Barry et al. (2010) hanno riferito di un aumento della presenza di cadaverina e putrescina in gatti riceventi FOS o pectine, mentre la supplementazione di due differenti diete per cani adulti formulate con carni crude di bovino o di pollame con inulina e lieviti ha indotto un aumento delle concentrazioni fecali di spermina (Beloshapka et al., 2012a). Sempre nel cane, l'integrazione della dieta con FOS è risultata promuovere l'aumento dei livelli di triptamina e tiramina (Swanson et al., 2002a) e delle concentrazioni di amine biogene totali (Propst et al., 2003). Diversamente da quanto già osservato, secondo uno studio condotto su cani adulti (Flickinger et al., 2003a), la somministrazione di FOS attraverso la dieta non ha alterato le concentrazioni fecali di putrescina e spermidina, mentre i valori di cadaverina e spermina sono risultati ridotti dalla presenza dell'oligosaccaride. Come già ricordato precedentemente, l'aumentata produzione di cadaverina e putrescina osservata in questo studio potrebbe derivare dal metabolismo dei batteri lattici qualora questi si ritrovino in condizioni di stress acidico, situazione presumibilmente promossa dalla presenza di FOS (Spano et al., 2010). Oltre ai FOS, anche le diete LD e HP hanno promosso un aumento dei livelli di alcune amine biogene, presumibilmente quale esito dell'aumentata attività proteolitica. Sulla base dei presenti risultati, la determinazione delle concentrazioni di amine biogene, al contrario di ammoniaca e acidi grassi a catena ramificata, non sembra rappresentare un valido indicatore del metabolismo proteico della flora microbica intestinale.

Al termine delle 24 h di fermentazione, una riduzione delle conte di lattobacilli ed enterococchi è stata osservata nelle bottiglie contenenti le diete HP, mentre le diete LD hanno mostrato una tendenza ad incrementare le conte di *C. perfringens*. Risultati analoghi sono stati osservati in altri lavori (Hesta et al., 2003; Zentek et al., 2004, 2003) condotti su cani adulti, dove la somministrazione di diete ricche in proteine di origine animale, soprattutto quelle contenenti matrici proteiche di scarsa qualità, ha favorito la crescita di popolazioni batteriche proteolitiche a scapito delle popolazioni di batteri lattici. Contrariamente a quanto precedentemente osservato, Nery et al. (2012) non hanno rilevato nessuna influenza di diete differenti per quantità e qualità delle fonti proteiche.

In questo lavoro, la presenza di FOS non ha promosso alcun aumento delle popolazioni di batteri lattici, mentre al termine delle 24 h di incubazione ha contribuito a ridurre le conte di lattobacilli negli inoculi fecali. Numerosi altri studi sono stati condotti per investigare sugli effetti dei fruttooligosaccaridi sul microbiota intestinale del cane, ottenendo talvolta risultati contraddittori. Secondo Flickinger et al. (2003a), la somministrazione di diete contenenti FOS ha contribuito a ridurre le conte fecali di *C. perfringens* nel cane, senza tuttavia esercitare effetti positivi sulle popolazioni di lattobacilli e bifidobatteri. Analogamente, altri Autori non hanno rilevato nessun tipo di influenza della somministrazione di FOS sulle popolazioni di batteri lattici (Barry et al., 2009; Strickling et al., 2000; Swanson et al., 2002a). Dai diversi studi condotti sulla specie canina è emerso come le popolazioni di bifidobatteri siano scarsamente rappresentative dell'ecosistema enterico e che non tutti i soggetti albergano specie di *Bifidobacterium* spp. nel proprio intestino (Beloshapka et al., 2013; Vanhoutte et al., 2005; Willard et al., 2000). Tuttavia, altri Autori hanno riscontrato un numero maggiore e più consistente di conte fecali di bifidobatteri (Middelbos et al., 2007; Swanson et al., 2002a). Nel presente lavoro, le popolazioni di *Bifidobacterium* spp. ($6.8 \log$ cellule/mL di liquido di fermentazione) non sono state influenzate da nessun trattamento. Tuttavia, poiché l'inoculo fecale utilizzato in questo studio è stato composto prelevando le feci di più animali e che nessuna di queste è stata analizzata singolarmente, non è stato possibile determinare se tutti i soggetti donatori abbiano albergato popolazioni di bifidobatteri nel proprio apparato gastroenterico.

I risultati elaborati dal presente studio hanno mostrato come diete ricche in fonti proteiche scarsamente digeribili possano influenzare negativamente l'ecosistema intestinale del cane, aumentando la presenza di composti derivanti dalle fermentazioni proteolitiche putrefattive e riducendo le conte delle popolazioni microbiche benefiche. Al contrario, la somministrazione di fruttooligosaccaridi ha ridotto l'attività proteolitica batterica e stimolato la produzione di acidi grassi volatili, contribuendo al miglioramento delle condizioni di salute dell'apparato enterico del cane.

7 Effetti sulla microflora intestinale del cane di diete addizionate di frutto-oligosaccaridi e differenti per qualità e quantità della frazione proteica

7.1 Materiali e metodi

La prova è stata condotta su un gruppo di 12 cani adulti e in buono stato di salute, regolarmente vaccinati e sottoposti a trattamento antiparassitario (Drontal Plus, Bayer S.p.A., Milano, Italia), di età compresa tra 1 e 6 anni e di peso corporeo medio 17 kg. Tutti i soggetti in prova non hanno manifestato problematiche di tipo gastroenterico nell'anno precedente l'inizio della ricerca. Gli animali, di proprietà di privati, durante la prova hanno continuato a rimanere sotto le cure del rispettivo proprietario.

Sei diete sperimentali secche estruse (EffeEffe Petfood S.p.A., Pieve di Porto Morone, Italia; tabella 15) per cani adulti sono state formulate mediante l'impiego dei seguenti ingredienti: cereali, carni e sottoprodotti delle carni, oli e grassi, estratti di proteine vegetali, minerali e lieviti. Le diete differivano per il tenore proteico, la qualità della fonte proteica e la presenza o meno di FOS (Beneo OPS, fruttooligosaccaridi da idrolisi parziale dell'inulina, con grado di polimerizzazione compreso tra 2 e 8; Beneo GmbH, Mannheim, Germania). Una farina di cicciolo suino altamente digeribile (digeribilità totale 71.2%) ha rappresentato la principale fonte di proteina animale delle diete; nella formulazione delle diete ad alto titolo proteico e a bassa digeribilità una farina di carne di suino e bovino a bassa digeribilità (digeribilità totale 31.4%) è stata associata alla farina di cicciolo.

Gli alimenti impiegati durante la prova non contenevano fonti significative di fibra solubile né tantomeno sostanze prebiotiche (ad eccezione delle diete addizionate di FOS) in quantità tali da poter nascondere le eventuali differenze tra trattamenti. Inoltre, ogni dieta è stata addizionata dello 0.5% di silice colloidale, impiegata come marker indigeribile ai fini della stima della digeribilità dei nutrienti. I fruttooligosaccaridi sono stati aggiunti, quando presenti, in ragione del 1.5%.

L'analisi chimica e la digeribilità *in vitro* delle diete e delle farine di carne impiegate come principale fonte proteica sono riportate nella tabella 16.

Ciascun animale ha ricevuto a rotazione, secondo uno schema 2×6, ognuna delle 6 diete sperimentali. Ogni dieta è stata somministrata per un periodo di 28 giorni, intervallato dalla somministrazione della dieta di controllo (dieta LP HD) per 12 giorni (periodo *wash-out*).

La quantità di alimento che ciascun cane ha ricevuto giornalmente è stata calcolata individualmente sulla base dei fabbisogni energetici dell'animale. I fabbisogni energetici di ciascun cane sono stati calcolati secondo la seguente equazione:

$$\text{kcal al giorno} = 132 \times \text{kg peso corporeo}^{0,75} \text{ (Case et al., 2011)}$$

attribuendo alla dieta, secondo i fattori di Atwater modificati per il cane, 3.5 kcal per grammo di proteine e amido e 8.5 kcal per grammo di lipidi.

Tabella 15 - Diete sperimentali oggetto della presente prova

| | |
|-------------|---|
| LP HD | bassa proteina (23% PG), alta digeribilità |
| HP HD | alta proteina (30% PG), alta digeribilità |
| HP LD | alta proteina (30% PG), bassa digeribilità |
| LP HD + FOS | bassa proteina (23%), alta digeribilità+ 1.5% FOS |
| HP HD + FOS | alta proteina (30% PG), alta digeribilità + 1.5% FOS |
| HP LD + FOS | alta proteina (30% PG), bassa digeribilità + 1.5% FOS |

Tabella 16 - Composizione chimica (% s.s.) e digeribilità (%) in vitro delle diete sperimentali e delle farine di carne impiegate come principale fonte proteica.

| | Umidità | Proteine gregge | Lipidi greggi | Ceneri gregge | Amido |
|--------------------------------|---------|-----------------|---------------|---------------|-------|
| Farina carne di bovino e suino | 0,72 | 62,9 | 9,6 | 24,1 | - |
| Farina di cicciolo suino | 1,85 | 68,5 | 16,1 | 15,1 | - |
| LP HD | 7,10 | 22,9 | 12,0 | 6,6 | 46,4 |
| HP HD | 6,54 | 30,4 | 14,0 | 8,2 | 36,4 |
| HP LD | 6,22 | 31,6 | 12,4 | 12,3 | 33,8 |
| LP HD + FOS | 6,11 | 24,1 | 11,8 | 6,7 | 45,6 |
| HP HD + FOS | 6,63 | 31,2 | 13,4 | 8,1 | 36,3 |
| HP LD + FOS | 6,35 | 29,6 | 12,2 | 12,4 | 33,6 |
| Digeribilità (%) | Totale | Proteine gregge | Lipidi greggi | Ceneri gregge | Amido |
| Farina carne di bovino e suino | 31,4 | 59,7 | 61,7 | 11,9 | - |
| Farina di cicciolo suino | 71,2 | 86,2 | 83,7 | 27,4 | - |
| LP HD | 84,0 | 88,9 | 95,2 | 48,1 | 92,5 |
| HP HD | 82,8 | 90,1 | 94,2 | 45,5 | 93,5 |
| HP LD | 68,0 | 78,6 | 93,7 | 11,8 | 97,9 |

7.2 Analisi chimiche e microbiologiche dei campioni

Ciascun proprietario degli animali in prova ha provveduto al prelievo di un campione di feci ai giorni 0, 21 e 28 dalla somministrazione di ciascuna dieta. Al momento della loro escrezione, i campioni sono stati raccolti in appositi contenitori sterili e immediatamente congelati.

Sui campioni di feci sono state svolte le seguenti analisi: pH, sostanza secca, ammoniaca, acidi grassi volatili, amine biogene e determinazione delle principali popolazioni batteriche.

Il pH è stato determinato solubilizzando una quantità nota di campione in acqua distillata (diluizione 1:10 p/v).

Per la determinazione dell'ammoniaca ci si è avvalsi di un apposito kit commerciale (Urea/BUN-Color, BioSystem S.A., Barcellona, Spagna).

Gli acidi grassi volatili sono stati determinati mediante gascromatografia, secondo la metodica descritta da Biagi et al. (2006). Per la determinazione delle amine biogene, i campioni sono stati preliminarmente diluiti 1:5 (p/v) in acido perclorico 0.3 M (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); successivamente, le amine biogene sono state separate mediante HPLC e quantificate tramite fluorimetria, secondo quanto descritto da Stefanelli et al. (1986).

Inoltre, gli ultimi 5 giorni di ciascuna sperimentazione si è provveduto a raccogliere quotidianamente un campione di feci da destinare alle analisi chimiche per la stima della digeribilità dei nutrienti.

Al fine di valutarne la digeribilità, le farine di carne adoperate nella formulazione delle diete sperimentali e le diete stesse sono state sottoposte a digestione *in vitro*, secondo la metodica proposta da Vervaeke *et al.* (1989) e modificata come proposto da Biagi *et al.* (2010a). Brevemente, ciascun campione è stato digerito in triplicato con una procedura a due step (2 h di incubazione a 39 °C in una soluzione di HCl 0.075 N, pepsina e lipasi gastrica a cui vengono successivamente aggiunti una miscela di sali biliari e pancreatina; seguono altre 4 h di incubazione a 39 °C).

Le analisi chimiche sulle diete e sulle rispettive frazioni indigerite sono state condotte seguendo le metodiche standard AOAC (AOAC, 2000; Metodo 954.01 per la proteina grezza, Metodo 920.39 per i lipidi grezzi, Metodo 920.40 per l'amido,

Metodo 942.05 per le ceneri grezze).). I minerali sono stati determinati mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico.

Il DNA batterico è stato estratto mediante l'uso di un kit commerciale QIAamp DNA Stool Mini-Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germania). La concentrazione (ng/μl) e la purezza del DNA estratto sono state determinate mediante spettrofotometro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA); il DNA genomico è stato quindi diluito (50 ng/μl) e congelato a -20 °C in attesa di successive analisi. Le popolazioni di batteri totali, *Escherichia coli*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. e *Clostridium perfringens* sono state quantificate mediante qPCR e avvalendosi di specifici primer (tabella 17).

L'amplificazione e la quantificazione del DNA genomico è stata eseguita mediante termociclatore MasterCycler ep realPlex⁴ (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germania). L'amplificazione è stata eseguita in duplicato per ciascun gruppo batterico; il protocollo è stato ottimizzato per un volume di reazione di 15 μl, contenente 7.5 μl di 2X SensiFAST No-ROX PCR Master Mix (Bioline GmbH, Luckenwalde, Germania), 4.8 μl di acqua priva di nucleasi, 0.6 μl di ciascun primer (concentrazione di 10 pmol) e 1.5 μl di DNA genomico.

Il ciclo di amplificazione è stato il seguente: denaturazione a 95 °C per 2 min, 95 °C for 5 s, appaiamento dei primer a 55–61 °C per 10 s ed estensione a 72 °C per 8 s. Il ciclo è stato ripetuto 40 volte.

Tabella 17 - Popolazioni batteriche oggetto del presente studio

| Target | Primer | Sequenza (5'-3') | Fonte |
|--------------------------------|------------------|--------------------------|-------------------------|
| Batteri totali | FP 16S | GGTAGTCYAYGCMSTAAACG | (Bach et al., 2002) |
| | RP 16S | GACARCCATGCASCACCTG | |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>E. coli</i> F | GTTAATACCTTTGCTCATTGA | (Malinen, 2003) |
| | <i>E. coli</i> R | ACCAGGGTATCTAATCC TGTT | |
| <i>Bifidobacterium</i> spp. | g-Bifid-F | CTCCTGGAAACGGGTGG | (Matsuki et al., 2002) |
| | g-Bifid-R | GGTGTTCTTCCCGATATCTACA | |
| <i>Lactobacillus</i> spp. | Lab-0159 | GGAAACAG(A/G)TGCTAATACCG | (Collier et al., 2003) |
| | Univ-0515 | ATCGTATTACCGCGGCTGCTGGCA | |
| <i>Enterococcus</i> spp. | EnteroF | CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT | (Rinttilä et al., 2004) |
| | EnteroR | ACTCGTTGTACTTCCCATTGT | |
| <i>Clostridium perfringens</i> | CP1 | AAAGATGGCATCATCATTCAAC | (Wang et al., 1994) |
| | CP2 | TACCGTCATTATCTTCCCCAAA | |

7.3 Analisi statistica dei dati

I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante ANOVA con il tenore proteico, la digeribilità proteica e la presenza di FOS come effetti principali. Le differenze sono state ritenute significative per $P < 0.05$. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite mediante il software Statistica 10.0 (Stat Soft Italia, Padova, Italia).

7.4 Risultati

Il contenuto in acqua delle feci, i valori di pH e le concentrazioni fecali di ammoniaca e di acidi grassi volatili sono riportati in tabella 18. Nel corso della presente prova è stata evidenziata una significativa riduzione ($P = 0.002$) del contenuto in acqua (56.9 vs. 62.8% per LD e HD, rispettivamente) nelle feci dei cani ricevuti le diete a bassa digeribilità, mentre la somministrazione delle diete ad alta digeribilità e delle diete contenenti FOS non hanno sortito alcun effetto sull'umidità fecale.

I valori di pH e le concentrazioni fecali di acidi grassi volatili non sono stati influenzati da nessuna delle diete sperimentali ($P > 0.05$).

Le concentrazioni fecali di ammoniaca (58.6 vs. 49.3 mmol/g per HP e LP, rispettivamente) sono risultate maggiori ($P < 0.001$) nei soggetti riceventi le diete ad alto tenore proteico, indipendentemente dal tipo di farina di carne adoperata nella formulazione.

La tabella 19 riporta le concentrazioni fecali di amine biogene. Nessuno dei trattamenti somministrati ha avuto alcun effetto sulle concentrazioni di putrescina, cadaverina e spermina ($P > 0.05$), mentre le diete ad alto tenore proteico hanno indotto un aumento delle concentrazioni di spermidina (565 vs. 486 $\mu\text{mol/g}$ per HP ed LP, rispettivamente; $P < 0.05$).

Nella tabella 20 sono riportati i valori di digeribilità apparente dei macronutrienti, macrominerali ed oligoelementi. La supplementazione con FOS ha determinato un miglioramento della digeribilità totale (85.5 vs. 83.5%; $P < 0.05$) e una tendenza ad incrementare la digeribilità delle ceneri grezze (51.5 vs. 43.1%; $P=0.010$) nei cani riceventi le diete addizionate di oligosaccaridi, mentre nei soggetti riceventi le diete a bassa digeribilità è stato osservato un peggioramento della digeribilità totale (80.1 vs. 86.6%; $P < 0.001$), della digeribilità proteica (81.9 vs. 86.4%; $P=0.007$) e della digeribilità delle ceneri grezze (38.0 vs. 51.6%; $P<0.001$). Riguardo l'assorbimento dei minerali, i FOS hanno determinato un miglioramento della digeribilità del calcio (23.3 vs. 6.5%; $P < 0.05$), del magnesio (21.6 vs. 0.6%; $P = 0.005$), dello zinco (28.5 vs. 12.4%; $P < 0.05$), del manganese (39.2 vs. 12.3%; $P < 0.001$) e del ferro (16.0 vs. 5.4%; $P < 0.05$).

I dati relativi alla numerosità dei batteri totali e delle popolazioni batteriche prese in esame sono riportati in tabella 21. Le diete contenenti FOS hanno indotto un aumento della popolazione fecale di *Escherichia coli* (5.7 vs. 5.2 log copie dsDNA/g; $P > 0.05$) ma non hanno avuto effetti sulle altre comunità batteriche, così come gli altri trattamenti sperimentali.

Tabella 18 - Valori di umidità, pH e concentrazioni di ammoniaca e acidi grassi volatili nei campioni fecali

| | LP HD | HP HD | HP LD | LP HD + FOS | HP HD + FOS | HP LD + FOS | ANOVA <i>P</i> | | |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|----------------|----------------|----------------|---------------------|--------------|-------|
| | | | | | | | Livello proteico | Digeribilità | FOS |
| Umidità, % | 64.6 | 62.9 | 53.6 | 59.7 | 62.8 | 58.7 | 0.781 | 0.002 | 0.854 |
| pH | 6.17 | 6.48 | 6.87 | 6.65 | 6.51 | 6.60 | 0.304 | 0.297 | 0.388 |
| NH ₃ , mmol/g | 45.6 | 56.6 | 56.0 | 39.3 | 65.5 | 52.9 | <0.001 | 0.041 | 0.591 |
| A. acetico, % AGV totali | 49.8 | 54.9 | 56.5 | 55.5 | 54.1 | 55.3 | 0.154 | 0.632 | 0.891 |
| A. propionico, % AGV totali | 34.0 | 30.3 | 29.4 | 31.3 | 33.8 | 31.8 | 0.706 | 0.934 | 0.187 |
| A. <i>n</i> -butirrico, % AGV totali | 9.76 | 9.99 | 9.55 | 9.29 | 8.27 | 9.43 | 0.276 | 0.854 | 0.377 |
| AGV totali, mmol/g | 169 | 159 | 149 | 121 | 167 | 143 | 0.140 | 0.364 | 0.303 |

Tabella 19 – Concentrazioni di amine biogene ($\mu\text{mol/g}$) nei campioni fecali

| | LP HD | HP HD | HP LD | LP HD + FOS | HP HD + FOS | HP LD + FOS | ANOVA <i>P</i> | | |
|------------|-------|-------|-------|----------------|----------------|----------------|---------------------|--------------|-------|
| | | | | | | | Livello proteico | Digeribilità | FOS |
| Putrescina | 718 | 765 | 824 | 695 | 709 | 703 | 0.752 | 0.785 | 0.394 |
| Cadaverina | 461 | 381 | 198 | 348 | 329 | 351 | 0.608 | 0.411 | 0.959 |
| Spermidina | 482 | 604 | 593 | 491 | 586 | 475 | 0.030 | 0.214 | 0.293 |
| Spermina | 341 | 271 | 298 | 383 | 293 | 241 | 0.127 | 0.807 | 0.962 |

Tabella 20 - Valori di digeribilità apparente dei macronutrienti, macrominerali ed oligoelementi (%)

| | LP HD | HP HD | HP LD | LP HD + FOS | HP HD + FOS | HP LD + FOS | ANOVA P | | |
|-----------------|-------|-------|-------|----------------|----------------|----------------|---------------------|--------------|--------|
| | | | | | | | Livello proteico | Digeribilità | FOS |
| Sostanza secca | 85.8 | 85.1 | 78.7 | 87.4 | 86.9 | 80.4 | 0.349 | < 0.001 | 0.028 |
| Proteine grezze | 84.5 | 87.6 | 83.7 | 87.6 | 84.4 | 79.2 | 0.858 | 0.007 | 0.330 |
| Ceneri grezze | 47.7 | 47.4 | 34.1 | 57.8 | 54.8 | 40.6 | 0.931 | < 0.001 | 0.010 |
| Ca | -0.71 | 3.91 | 16.3 | 12.7 | 25.0 | 32.9 | 0.316 | 0.235 | 0.016 |
| P | 39.4 | 39.7 | 31.5 | 40.1 | 38.2 | 43.0 | 0.937 | 0.851 | 0.671 |
| Mg | 5.30 | -6.41 | 2.90 | 8.45 | 22.6 | 34.8 | 0.891 | 0.249 | 0.005 |
| Na | 95.9 | 96.7 | 94.5 | 97.0 | 97.7 | 94.3 | 0.158 | <0.0001 | 0.162 |
| K | 96.2 | 95.2 | 90.8 | 95.5 | 96.0 | 91.9 | 0.706 | <0.0001 | 0.464 |
| Zn | 17.1 | 20.7 | -0.52 | 31.8 | 33.1 | 19.8 | 0.755 | 0.029 | 0.016 |
| Mn | 14.1 | 19.0 | 3.74 | 91.8 | 9.90 | 13.9 | <0.0001 | 0.545 | <0.001 |
| Fe | 0.06 | 1.28 | 14.9 | 18.6 | 12.7 | 16.9 | 0.703 | 0.146 | 0.036 |
| Cu | 26.2 | 36.7 | 29.5 | 44.7 | 38.8 | 28.3 | 0.782 | 0.307 | 0.341 |

Tabella 21 – Batteri totali e popolazioni batteriche oggetto del presente studio (log copie dsDNA/g di feci)

| | LP HD | HP HD | HP LD | LP HD + FOS | HP HD + FOS | HP LD + FOS | ANOVA <i>P</i> | | |
|-----------------------------|-------|-------|-------|----------------|----------------|----------------|---------------------|--------------|-------|
| | | | | | | | Livello proteico | Digeribilità | FOS |
| Batteri totali | 8.87 | 8.54 | 8.60 | 8.90 | 8.87 | 8.79 | 0.434 | 0.944 | 0.445 |
| <i>Escherichia coli</i> | 5.47 | 5.22 | 4.61 | 5.52 | 5.79 | 5.69 | 0.874 | 0.253 | 0.012 |
| <i>Bifidobacterium</i> spp. | 5.36 | 4.31 | 3.54 | 4.00 | 4.19 | 4.38 | 0.191 | 0.690 | 0.526 |
| <i>Lactobacillus</i> spp. | 8.59 | 8.16 | 8.37 | 8.57 | 8.49 | 8.58 | 0.218 | 0.461 | 0.410 |
| <i>Enterococcus</i> spp. | 5.53 | 5.56 | 5.89 | 5.93 | 6.03 | 5.94 | 0.892 | 0.696 | 0.264 |
| <i>C. perfringens</i> | 5.58 | 5.44 | 5.86 | 5.62 | 5.92 | 5.78 | 0.980 | 0.645 | 0.693 |

7.5 Discussione

Il presente studio si proponeva di valutare gli effetti dell'aggiunta di FOS a diete per cani che differivano per tenore e qualità delle proteine presenti. La scelta delle farine di carne e la loro percentuale di inclusione nella formulazione delle diete si è basata sulla volontà di accentuare gli eventuali effetti sulla microflora intestinale del cane di fonti proteiche animali di scarsa qualità rispetto a fonti facilmente digeribili.

Durante la prova tutti gli animali sono rimasti in buona salute e nessuno ha manifestato problematiche di tipo gastroenterico.

Nel corso della presente prova è stata evidenziata una significativa riduzione del contenuto in acqua (56.9 vs. 62.8%; $P < 0.001$) nelle feci dei cani riceventi le diete a bassa digeribilità; questo dato risulta in contrasto con quanto precedentemente osservato da altri Autori (Nery et al., 2010; Zentek, 1995b; Zentek et al., 2002, 1998) in soggetti riceventi diete contenenti fonti proteiche di scarsa qualità. Hang et al. (2013) hanno studiato l'impatto di una dieta altamente proteica (609 g di PG per kg di dieta) e contenente farina di cicciolo suino altamente digeribile sull'alimentazione del cane, osservando come questa inducesse fenomeni diarroici in tutti i soggetti oggetto della prova. Dal punto di vista del proprietario, in genere, l'aumento dell'umidità fecale non è particolarmente gradito, in quanto esso comporta un aumento della massa fecale, della frequenza di defecazione e la riduzione della consistenza delle feci, nonché la possibilità di un aumento della persistenza nel tempo di odori sgradevoli. Al contrario, da un punto di vista prettamente clinico, un certo tenore di umidità delle feci associato ovviamente a un mantenimento della loro giusta consistenza è considerato un aspetto positivo perché riduce il rischio di problematiche quali costipazione e megacolon da fecaloma.

Analogamente al presente lavoro, anche Swanson et al. (2002b) non hanno riportato differenze relative al pH fecale in cani riceventi 2 g/d di FOS, contrariamente a quanto osservato da altri Autori, che riportano una riduzione del pH fecale nel cane in seguito a integrazioni della dieta con FOS, seppur a percentuali di inclusione diverse da quelle del presente studio (0.095% per Félix et al., 2013; 3 e 6% per Twomey et al., 2003). Anche gli altri trattamenti non hanno

sortito alcun effetto per quanto riguarda il pH fecale. Tuttavia, Hang et al. (2013) hanno osservato un aumento del pH fecale in cani riceventi una dieta altamente proteica (609 g di PG per kg di dieta) e contenente, analogamente al presente lavoro, farina di cicciolo suino. Contestualmente allo studio di Hang et al. (2013), l'incremento del pH fecale in cani riceventi diete contenenti alte percentuali di inclusione di proteina è stato osservato anche in altri lavori (Hesta et al., 2003; Zentek et al., 2004, 2003).

La somministrazione delle diete non ha avuto alcuna influenza sul profilo in acidi grassi volatili delle feci dei soggetti partecipanti allo studio. Diversi Autori hanno osservato un aumento significativo delle concentrazioni di AGV totali (Twomey et al., 2003), acido n-butirrico (Propst et al., 2003; Swanson et al., 2002a) e acido propionico, sia *in vitro* (Biagi et al., 2010a) che *in vivo* (Flickinger et al., 2003a; Swanson et al., 2002c), mentre Barry et al. (2009) hanno descritto come una percentuale di inclusione di FOS dello 0.4% avesse indotto una riduzione della concentrazione di acido acetico e un aumento delle concentrazioni di butirrato, isobutirrato e isovalerato nelle feci di cani adulti. Nel lavoro di Hang et al. (2013) la somministrazione di diete ricche in proteina ha determinato una riduzione delle concentrazioni di acetato e propionato e un incremento dei livelli di acidi grassi a catena ramificata, i quali originano esclusivamente dalla degradazione batterica delle proteine. Oltre alla tipologia di dieta, anche i processi tecnologici di trasformazione hanno influenza sull'esito delle fermentazioni microbiche: secondo Zentek et al. (2004), la somministrazione di una dieta umida contenente pollo e/o manzo ha indotto una riduzione delle concentrazioni fecali di acidi grassi volatili e incrementato la concentrazione di valerato, rispetto ai cani riceventi una dieta secca estrusa contenente pollo. In questa prova le concentrazioni fecali di ammoniaca non sono state influenzate dalla presenza di FOS, coerentemente con quanto osservato da Swanson et al. (2002a,b), Hesta et al. (2003), Barry et al. (2009) e, *in vitro*, da Biagi et al. (2010a). Nei cani riceventi le diete ad alto tenore proteico, indipendentemente dal tipo di farina di carne adoperata nella formulazione, è stato osservato un aumento delle concentrazioni fecali di ammoniaca. Questo dato risulta essere in accordo con quanto riportato in altri studi (Hang et al., 2013; Hesta et al., 2003; Nery et al., 2012; Zentek et al., 2004, 2003). Presumibilmente, con l'assunzione di diete ad alto tenore proteico, una certa quota della matrice proteica sfugge all'azione degli enzimi digestivi e giunge

nel colon, rendendosi disponibile come substrato per le fermentazioni proteolitiche.

Nessuno dei trattamenti somministrati ha determinato alcun effetto sulle concentrazioni di putrescina, cadaverina e spermina, mentre le diete ad alto tenore proteico hanno indotto un aumento delle concentrazioni di spermidina. Questo dato appare in contraddizione con quanto osservato nell'analogo studio *in vitro* esposto precedentemente nella presente dissertazione, dove le concentrazioni di spermidina sono risultate essere più alte negli inoculi fecali contenenti le diete a basso titolo proteico rispetto ai trattamenti ad alta proteina, sia a 6 che a 24 h di fermentazione. Le diete contenenti FOS non hanno influito sulle concentrazioni di amine biogene, contrariamente a quanto osservato nell'analoga prova *in vitro*, dove la fermentazione di fruttooligosaccaridi ha promosso un aumento delle concentrazioni di spermina e putrescina. Nel gatto, la fermentazione di FOS, pectine e galattooligosaccaridi ha favorito un aumento delle concentrazioni di putrescina (Pinna et al., 2014) o cadaverina e putrescina (Barry et al., 2010), mentre, nel cane, la supplementazione di due differenti diete per soggetti adulti formulate con carni crude di bovino o di pollame con inulina e lieviti ha indotto un aumento delle concentrazioni fecali di spermina (Beloshapka et al., 2012a). Sempre nel cane, l'integrazione della dieta con FOS è risultata promuovere l'aumento dei livelli di triptamina e tiramina (Swanson et al., 2002a) e delle concentrazioni di amine biogene totali (Propst et al., 2003). Diversamente da quanto già osservato, secondo uno studio condotto su cani adulti (Flickinger et al., 2003a), la somministrazione di FOS attraverso la dieta non ha alterato le concentrazioni fecali di putrescina e spermidina, mentre i valori di cadaverina e spermina sono risultati ridotti dalla presenza del prebiotico.

Nel presente lavoro è stato osservato un miglioramento della digeribilità totale nei cani riceventi le diete addizionate con FOS (85.5 vs. 83.5%). Numerosi Autori hanno riportato un peggioramento della digeribilità della sostanza organica e di quella proteica apparente associato al consumo di sostanze prebiotiche (Beloshapka et al., 2012b; Diez et al., 1998a, 1998b, 1997; Flickinger et al., 2003a; Hesta et al., 2003; Middelbos et al., 2007; Propst et al., 2003; Zentek et al., 2002b) Secondo quanto riportato da Hesta *et al.* (2003) e da Karr-Lilienthal et al. (2004), una maggiore escrezione di azoto fecale è stata associata all'impiego di oligosaccaridi nell'alimentazione dell'uomo e degli animali da compagnia, in

quanto questi stimolano lo sviluppo microbico e il conseguente aumento della massa batterica nelle feci; ne risulta, di conseguenza, un peggioramento della digeribilità proteica apparente e, conseguentemente di quella totale. Tuttavia in questo studio, e analogamente a quanto osservato da Twomey et al. (2003), non sono stati osservati effetti dei FOS sulla digeribilità proteica delle diete sperimentali. La migliore digeribilità osservata nei soggetti riceventi le diete contenenti FOS è correlata all'aumentata digeribilità delle ceneri grezze, attribuibile ad un maggior assorbimento intestinale dei minerali indotto dal consumo del prebiotico. L'aumentato assorbimento del calcio e del magnesio osservato in questa prova è stato documentato anche da Beynen et al. (2002) in cani riceventi oligofruztosio (10 g/kg di dieta) o lattulosio (1 e 3 g/MJ di energia metabolizzabile; Beynen et al., 2001). In questa prova, l'assorbimento del fosforo non è stato condizionato dalla presenza di oligosaccaridi, analogamente a quanto riportato da Beynen et al. (2002, 2001).

Sembra infatti che il consumo di sostanze prebiotiche possa promuovere l'assimilazione dei minerali attraverso numerosi meccanismi, quali un'aumentata solubilità degli stessi in ambiente acido e una maggiore proliferazione degli enterociti indotti dall'aumentata produzione di AGV da parte del microbiota, oltre ad una aumentata espressione genica delle proteine leganti il calcio (Scholz-Ahrens et al., 2007).

La somministrazione delle diete integrate con fruttooligosaccaridi ha determinato un incremento di *Escherichia coli*, senza sortire effetti sulla numerosità dei batteri totali e delle altre popolazioni. Diversi Autori hanno riportato come l'assunzione di diete contenenti fruttooligosaccaridi possa esercitare effetti positivi sulla microflora intestinale del cane (Middelbos et al., 2007; Swanson et al., 2002a), contribuendo all'incremento di quelle specie batteriche considerate virtuose a scapito di quelle considerate sgradite. Contrariamente a quanto osservato nel presente studio, nel gatto la somministrazione di FOS ha determinato una riduzione delle conte fecali di *E. coli* (Barry et al., 2010), mentre nel cane l'integrazione della dieta con FOS (Howard et al., 2000; Strickling et al., 2000; Willard et al., 2000) od oligofruztosio (Flickinger et al., 2003a) non ha avuto alcun effetto sulle popolazioni fecali di coliformi.

Le diete ad alto titolo proteico, indipendentemente dal livello di digeribilità, non hanno modificato il microbiota fecale dei cani del presente studio.

Hang et al. (2012) hanno osservato la scomparsa degli ordini *Lactobacillales* e *Bacteroidales* dalle feci dei cani in prova in seguito alla somministrazione di diete ad elevato tenore proteico (609 g di PG per kg di dieta), mentre altri Autori (Zentek, 1995a, 1995b, 1995c) hanno riportato altri effetti negativi legati alla somministrazione nel cane di diete altamente proteiche e di scarsa qualità, quali la diminuzione delle conte di bifidobatteri e un aumento della concentrazione fecali di *Clostridium perfringens*, probabilmente attribuibili all'aumentata quota di proteina indigerita che giunge nel colon. Quest'ultimo risultato è stato osservato anche in cani riceventi diete contenenti proteine di origine animale (pollo e/manzo) rispetto ai soggetti riceventi una dieta secca estrusa (Zentek et al., 2004).

Un recente studio condotto su gattini (8-16 settimane) alimentati con una dieta moderatamente proteica (dieta LP, 34% di PG sulla SS) o con una dieta ad elevato contenuto in proteina (dieta HP, 52% di PG sulla SS) ha mostrato importanti cambiamenti del microbiota fecale attribuibili ai diversi regimi dietetici. Infatti, una quota più grande dei phyla Firmicutes, Fusobacteria e Proteobacteria è stata identificata nei gattini alimentati con la dieta HP rispetto ai soggetti riceventi la dieta LP (Hooda et al., 2013).

I risultati ottenuti nel corso del presente studio hanno mostrato come l'impiego di fruttooligosaccaridi nell'alimentazione del cane possa determinare un miglioramento dell'assorbimento intestinale dei minerali. Tuttavia, la loro presenza non sembra contrastare gli effetti negativi che diete ad alto tenore proteico potrebbero avere sull'ecosistema intestinale dell'animale. Infatti, sulla base dei presenti dati, è ipotizzabile come l'impiego di diete ricche di proteine, tanto più se poco digeribili, possa avere conseguenze negative sull'ambiente intestinale, come una riduzione dell'umidità delle feci e l'aumento delle concentrazioni di ammoniaca fecale.

8 Valutazione in vitro degli effetti di un estratto a base di tannini e di *Yucca schidigera* sul microbiota intestinale del gatto

8.1 Materiali e metodi

Quattro gatti adulti (femmine di razza europea; peso corporeo medio 4 kg; età media 5 anni) di proprietà di privati e viventi confinati in appartamento sono stati alimentati per 4 settimane con una dieta secca commerciale per gatti adulti (COOP Italia, Bologna, Italy), formulata con i seguenti ingredienti: cereali, carne e sottoprodotti della carne, sottoprodotti di origine vegetale, pesci e sottoprodotti dei pesci, estratti di proteine vegetali, olii e grassi, minerali e vegetali.

Le feci dei gatti sono state raccolte immediatamente dopo l'escrezione, mescolate tra loro e diluite 1:10 p/v in Wilkins Chalgren Anaerobe Broth (WCAB 0.5x; Oxoid, Basingstoke, UK). L'inoculo fecale così ottenuto è stato ulteriormente diluito in terreno di arricchimento (100 ml/L), secondo quanto proposto da Sunvold et al. (1995b; tabella 1) e dispensato in 5 boccette da 30 mL per ciascun trattamento. Ciascuna boccetta conteneva il residuo indigerito della stessa dieta precedentemente somministrata ai gatti donatori, sottoposta a digestione in vitro secondo la metodica proposta da Vervaeke et al. (1989) e modificata (2 h di incubazione con HCl, pepsina e lipasi gastrica seguita da 4 h di incubazione con pancreatina e sali biliari) come descritto da Biagi et al. (2010a). La composizione della dieta somministrata agli animali e del suo residuo indigerito è riportata nella tabella 2.

Gli effetti di 4 trattamenti sono stati valutati: 1) dieta di controllo (CTRL) senza nessuna aggiunta di substrati sperimentali; 2) estratto di *Yucca schidigera* (Sintonyse, Sintofarm S.p.A., Guastalla, Italia); 3) tannini (Farmatan 75, tannini estratti dal legno di castagno, Sintofarm S.p.A., Guastalla, Italia); 4) associazione *Yucca* + tannini.

I substrati oggetto della prova sono stati aggiunti all'inoculo fecale ad una concentrazione finale di 0.1 g/L, 0.3 g/L e 0.1 g + 0.3 g/L per *Yucca*, tannini e *Yucca* + tannini, rispettivamente. Il residuo indigerito della dieta è stato aggiunto all'inoculo fecale in ragione di 20 g/L. La scelta di queste concentrazioni rispecchia l'ammontare di substrato indigeribile che dovrebbe raggiungere il grosso intestino qualora il soggetto assuma una dieta commerciale secca addizionata di un estratto di tannini e *Yucca* alla concentrazione di 1.5 g/kg e 0.5 g/kg, rispettivamente. Infatti, se consideriamo il coefficiente di digeribilità di un alimento "superpremium" pari a 0.9 e assumendo che tutto il supplemento indigeribile raggiunga il colon, il rapporto tra la quota indigerita della dieta e il supplemento nel grosso intestino sarà approssimativamente pari a 10:1.

Inoltre, per ciascuno studio, 5 ulteriori bottiglie sono state allestite quale controllo negativo, contenenti il solo inoculo fecale e senza l'aggiunta di alcun substrato sperimentale o di frazione indigerita della dieta. Il pH degli inoculi fecali è stato regolato a 6.7; le bottiglie sono state quindi sigillate ermeticamente e poste a incubare in atmosfera controllata (85% N₂, 10% CO₂ e 5% H₂) per 24 h a 39 °C all'interno di una camera anaerobica (Anaerobic System; Forma Scientific Co., Marietta, OH, USA). Campioni di liquido di fermentazione sono stati raccolti da ciascuna bottiglia a 6 e 24 h, immediatamente congelati a -80 °C e destinati alle successive analisi per la determinazione del pH, dell'ammoniaca, degli acidi grassi volatili e delle principali popolazioni batteriche. I campioni raccolti a 24 h sono stati destinati anche all'analisi gascromatografica per la determinazione dei composti volatili.

8.2 Analisi chimiche e microbiologiche dei campioni

Le analisi sulla dieta secca estrusa, sulla farina di carne e sulle frazioni indigerite delle diete sono state condotte seguendo le metodiche standard AOAC (AOAC, 2000; Metodo 954.01 per la proteina grezza, Metodo 920.39 per i lipidi grezzi, Metodo 920.40 per l'amido, Metodo 942.05 per le ceneri grezze, Metodo 962.09 per la fibra grezza). Le frazioni fibrose sono state determinate secondo la metodica proposta da Van Soest et al. (1991). L'ammoniaca è stata determinata mediante l'impiego di un apposito kit commerciale (Urea/BUN-Color, BioSystem S.A., Barcellona, Spagna). Gli acidi grassi volatili sono stati determinati mediante gascromatografia, secondo la metodica descritta da Biagi et al. (2006).

La determinazione dei composti volatili è stata effettuata secondo il metodo suggerito da Ahmed et al. (2013). Per la determinazione dei composti volatili è stata utilizzata la tecnica di micro-estrazione in fase solida dello spazio di testa (HS-SPME) seguita da una analisi gascromatografica e rivelazione mediante spettrometro di massa (GC-MS). La tecnica prevede una prima fase di concentrazione/estrazione dei componenti volatili a livello del rivestimento della fibra ed una fase di desorbimento degli analiti concentrati dal rivestimento alla strumentazione analitica (gascromatografo). Per questa tipologia d'analisi è stata utilizzata una fibra trifasica che permette di adsorbire sostanze con vasto range di polarità (acidi, alcoli, terpeni, idrocarburi, ecc.). Un mL di fermentato è stato inserito direttamente in vials ambrati di 7 mL di capacità (Supelco, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), le quali sono state subito chiuse ermeticamente. Il campione è stato posto su agitatore termico, ad una temperatura di 60°C per 60 min, per favorire il trasferimento dei composti volatili nello spazio di testa delle vials dove la fibra è stata poi esposta per 10 min. La microfibra utilizzata era di tipo SPME, 2 cm 23-Gauge e spessore 50/30 µm (Supelco, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). La fase di assorbimento ha previsto una temperatura di 55 °C per 45 min. Una volta conclusa la fase di assorbimento, la fibra è stata nuovamente riportata all'interno della protezione ed inserita per 10 min nell'iniettore del gascromatografo (a 250 °C), dove gli analiti concentrati sono stati desorbiti. Dopo 10 min di desorbimento, la fibra è stata riposta nella sua protezione e rimossa dall'iniettore.

La successiva separazione dei composti volatili è stata fatta attraverso l'impiego di un gascromatografo con colonna Supelcowax TM10 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm I.D; Supelco, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). La fase mobile era costituita da elio, regolato ad un flusso di 1.0 mL/min. La temperatura del forno è stata programmata a 45 °C per 10 min, successivamente incrementata fino a 200 °C a 3 °C/min, per concludersi con un'isoterma finale di 10 min.

Lo spettrometro di massa impiegato per la successiva quantificazione dei composti volatili è stato impostato con una temperatura della sorgente ionizzante pari a 230 °C, una temperatura di interfaccia I/F di 210 °C, un voltaggio del detector pari a 1,03 KV ed un intervallo di acquisizione pari a 33-400 (m/z).

L'acquisizione dei dati è stata effettuata mediante il software GC-MS Solution (Shimadzu, Kyoto, Giappone).

L'estrazione del DNA batterico è stata condotta sui campioni di liquido di fermentazione prelevati a 6 e 24 h, secondo la metodica descritta da Condezo-Hoyos et al. (2014). Brevemente, 2 mL di liquido di fermentazione sono stati centrifugati a 15'000g per 5 min a 4 °C allo scopo di raccogliere il pellet contenente le cellule batteriche e separare il surnatante da destinare all'analisi dei composti volatili secondo la metodica sopra descritta. Il DNA batterico è stato estratto dal pellet mediante apposito kit commerciale (QIAamp Fast DNA Stool Mini-Kit; QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) seguendo il protocollo del produttore. La concentrazione e la purezza del DNA estratto sono state misurate mediante spettrofotometro (NanoDrop 1000; Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA); si è quindi proceduto ad uniformare tutti i campioni alla medesima concentrazione di DNA (50 ng/μl).

Le popolazioni batteriche di *Escherichia coli*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. ed *Enterococcus* spp. sono state quantificate mediante qPCR attraverso l'uso di primer specifici (tabella 22). L'amplificazione e la quantificazione del DNA genomico è stata eseguita mediante termociclatore CFX96 Touch (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). L'amplificazione è stata eseguita in duplicato per ciascun gruppo batterico; il protocollo è stato ottimizzato per un volume di reazione di 15 μl, contenente 7.5 μl di 2X SensiFAST No-ROX PCR Master Mix (Bioline GmbH, Luckenwalde, Germany), 4.8 μl di acqua priva di nucleasi, 0.6 μl di ciascun primer (concentrazione di 10 pmol) e 1.5 μl di DNA genomico.

Il ciclo di amplificazione è stato il seguente: denaturazione a 95°C per 2 min, 95°C for 5 s, appaiamento dei primers a 55–61°C per 10 s ed estensione a 72°C per 8 s. Il ciclo è stato ripetuto 40 volte.

Tabella 22 - Popolazioni batteriche oggetto del presente studio

| Target | Primer | Sequenza (5'-3') | Fonte |
|-----------------------------|------------------|--------------------------|-------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | <i>E. coli</i> F | GTTAATACCTTTGCTCATTGA | (Malinen, 2003) |
| | <i>E. coli</i> R | ACCAGGGTATCTAATCC TGTT | |
| <i>Bifidobacterium</i> spp. | g-Bifid-F | CTCCTGGAAACGGGTGG | (Matsuki et al., 2002) |
| | g-Bifid-R | GGTGTTCCTCCCGATATCTACA | |
| <i>Lactobacillus</i> spp. | Lab-0159 | GGAAACAG(A/G)TGCTAATACCG | (Collier et al., 2003) |
| | Univ-0515 | ATCGTATTACCGCGGCTGCTGGCA | |
| <i>Enterococcus</i> spp. | Enterof | CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT | (Rinttilä et al., 2004) |
| | Enteror | ACTCGTTGTACTIONCCATTGT | |

8.3 Analisi statistica dei dati

I risultati sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante ANOVA a 2 vie, con tannini e yucca come effetti principali. Le differenze tra i gruppi sono state analizzate mediante il test di Newman-Keuls e ritenute significative per $P < 0.05$. Ciascuna bottiglia ha rappresentato una singola unità sperimentale. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite mediante il software Statistica 10.0 (Stat Soft Italia, Padova, Italia).

8.4 Risultati

I risultati relativi ai valori di pH e di ammoniaca rilevati nei campioni di liquido di fermentazione prelevati dopo 6 e dopo 24 h dall'inizio della prova sono riportati in tabella 23.

L'analisi statistica dei dati relativi ai prelievi effettuati a 6 h ha permesso di evidenziare una lieve diminuzione del pH nei campioni contenenti la yucca ($P = 0.021$). Tale effetto non si è, tuttavia, mantenuto, ad opera di tale substrato, fino al termine delle 24 ore di fermentazione. Al contrario, al termine di quest'ultima, un modesto innalzamento del pH si è registrato nei campioni contenenti i tannini ($P < 0.0001$).

Per quanto concerne le concentrazioni di ammoniaca nei campioni di liquido di fermentazione, non sono stato evidenziati effetti significativi in nessuno dei due tempi di prelievo previsti dal protocollo sperimentale.

I risultati relativi alla determinazione degli acidi grassi volatili rilevati nei campioni prelevati dopo 6 e 24 h dall'inizio della fermentazione sono riportati in tabella 24 e tabella 25 ed espressi, rispettivamente, come concentrazione (mmol/L) e come % sul totale degli acidi grassi. Per quanto riguarda gli effetti sugli acidi grassi volatili, la presenza della yucca ha determinato una diminuzione delle concentrazioni di acido acetico ($P = 0.010$), acido *n*-valerico ($P = 0.006$) e degli acidi grassi volatili totali ($P = 0.052$) dopo 6 ore di fermentazione. Sempre dopo 6 h di incubazione, la yucca ha evidenziato una diminuzione della percentuale di acido *n*-valerico ($P = 0.021$).

Per quanto riguarda i tannini, è stato rilevato come essi abbiano portato ad una diminuzione significativa delle concentrazioni di acido propionico a 6 ore dall'inizio della prova ($P = 0.010$) e di quella dell'acido acetico ($P < 0.05$), dell'acido propionico ($P < 0.0001$), dell'acido isovalerico ($P = 0.039$) e degli acidi grassi volatili totali ($P = 0.002$) a 24 ore dall'inizio della prova.

Gli stessi tannini hanno, inoltre, influenzato la composizione percentuale di alcuni acidi grassi sul totale; in particolare, è stata registrata sia a 6 che a 24 ore di fermentazione una diminuzione significativa della percentuale di acido propionico ($P = 0.028$ e 0.004 , rispettivamente). Inoltre, dopo 6 ore dall'inizio della prova, si è osservato, sempre ad opera dei tannini, un incremento della percentuale di *n*-butirrato ($P = 0.015$), mentre al termine della fermentazione è stato possibile rilevare un aumento significativo della presenza di acido *n*-valerico ($P < 0.05$) rispetto al totale degli acidi grassi volatili.

Per quanto riguarda i composti volatili, fra le 67 molecole preliminarmente identificate, ne sono state selezionate e considerate solamente 11, sulla base del loro significato biologico, nonché del loro ammontare e della loro presenza in tutti i campioni di inoculo fecale prelevati al termine delle 24 h di incubazione. I valori medi relativi a tali composti, espressi come media delle aree dei corrispondenti picchi cromatografici per mL di liquido di fermentazione, sono riportati in tabella 26. Sia tannini, yucca o la loro interazione hanno evidenziato un significativo decremento dell'acido solfidrico nei rispettivi campioni (rispettivamente $P = 0.046$, 0.012 e 0.002). Accanto ad un incremento determinato dalla presenza dei tannini sull'entità del *p*-cresolo ($P = 0.003$), è stata osservata una tendenza da parte di questi ultimi e della loro interazione con la yucca a diminuire il dimetil solfuro ($P = 0.102$ e 0.072 , rispettivamente).

I dati relativi alla numerosità delle popolazioni batteriche di interesse sono riportati in tabella 27.

Le analisi microbiologiche hanno permesso di evidenziare una tendenziale diminuzione della popolazione dei lattobacilli in presenza dei tannini a 24 h di fermentazione. Gli effetti derivanti dalla presenza dei tannini o dall'interazione tannini+yucca sulla popolazione di enterococchi a 6 h di prova risultano, invece, alquanto difficili da interpretare.

Tabella 23 – Valori medi di pH e concentrazioni di ammoniaca (mmol/L) dopo 6 e 24 h di incubazione di un inoculo fecale di gatto in presenza di yucca e tannini

| | CTRL | Tannini | Yucca | Tannini + yucca | ANOVA <i>P</i> | | |
|--------------------------|------|---------|-------|--------------------|----------------|-------|--------------------|
| | | | | | Tannini | Yucca | Tannini × yucca |
| <i>6 h</i> | | | | | | | |
| pH | 6.28 | 6.28 | 6.24 | 6.26 | 0.337 | 0.021 | 0.372 |
| NH ₃ , mmol/L | 33.4 | 34.9 | 34.0 | 33.5 | 0.571 | 0.664 | 0.233 |
| <i>24 h</i> | | | | | | | |
| pH | 6.10 | 6.14 | 6.05 | 6.17 | <0.0001 | 0.344 | 0.004 |
| NH ₃ , mmol/L | 52.2 | 50.9 | 48.7 | 52.0 | 0.777 | 0.744 | 0.536 |

Tabella 24 - Concentrazione media in acidi grassi volatili (mmol/L) dei campioni di liquido di fermentazione dopo 6 e 24 h dall'inizio della prova nei 4 gruppi sperimentali esaminati.

| | CTRL | Tannini | Yucca | Tannini + yucca | ANOVA <i>P</i> | | |
|------------------------|------|---------|-------|--------------------|----------------|-------|--------------------|
| | | | | | Tannini | Yucca | Tannini × yucca |
| <i>6 h</i> | | | | | | | |
| A. acetico | 14.8 | 13.3 | 12.7 | 12.1 | 0.082 | 0.010 | 0.385 |
| A. propionico | 7.09 | 6.51 | 7.16 | 5.99 | 0.010 | 0.446 | 0.335 |
| A. isobutirrico | 0.53 | 0.39 | 0.51 | 0.53 | 0.583 | 0.602 | 0.498 |
| A. <i>n</i> -butirrico | 7.54 | 7.96 | 7.58 | 7.49 | 0.666 | 0.558 | 0.489 |
| A. isovalerico | 0.63 | 0.65 | 0.62 | 0.68 | 0.646 | 0.894 | 0.788 |
| A. <i>n</i> -valerico | 0.38 | 0.32 | 0.25 | 0.24 | 0.348 | 0.006 | 0.455 |
| AGV totali | 31.0 | 29.1 | 28.8 | 27.1 | 0.092 | 0.052 | 0.942 |
| <i>24 h</i> | | | | | | | |
| A. acetico | 24.2 | 22.4 | 23.6 | 21.7 | 0.044 | 0.451 | 0.961 |
| A. propionico | 12.7 | 10.6 | 12.8 | 10.0 | <0.0001 | 0.681 | 0.393 |
| A. isobutirrico | 1.21 | 1.21 | 1.11 | 1.10 | 0.974 | 0.383 | 0.987 |
| A. <i>n</i> -butirrico | 10.1 | 9.68 | 9.86 | 9.29 | 0.095 | 0.292 | 0.718 |
| A. isovalerico | 2.01 | 1.95 | 2.26 | 1.80 | 0.039 | 0.686 | 0.108 |
| A. <i>n</i> -valerico | 2.29 | 3.03 | 2.60 | 3.12 | 0.109 | 0.599 | 0.774 |
| AGV totali | 52.5 | 48.9 | 52.3 | 47.1 | 0.002 | 0.422 | 0.497 |

Tabella 25 - Composizione percentuale media in acidi grassi volatili (%) dei campioni di liquido di fermentazione dopo 6 e 24 h dall'inizio della prova nei 4 gruppi sperimentali esaminati.

| | CTRL | Tannini | Yucca | Tannini + yucca | ANOVA <i>P</i> | | |
|------------------------|------|---------|-------|--------------------|----------------|-------|--------------------|
| | | | | | Tannini | Yucca | Tannini × yucca |
| <i>6 h</i> | | | | | | | |
| A. acetico | 47.9 | 45.7 | 44.0 | 44.9 | 0.658 | 0.129 | 0.286 |
| A. propionico | 22.9 | 22.3 | 24.9 | 22.1 | 0.028 | 0.216 | 0.122 |
| A. isobutirrico | 1.72 | 1.35 | 1.79 | 1.92 | 0.747 | 0.388 | 0.510 |
| A. <i>n</i> -butirrico | 24.3 | 27.3 | 26.3 | 27.7 | 0.015 | 0.157 | 0.303 |
| A. isovalerico | 1.99 | 2.22 | 2.15 | 2.48 | 0.218 | 0.344 | 0.815 |
| A. <i>n</i> -valerico | 1.21 | 1.10 | 0.85 | 0.90 | 0.771 | 0.021 | 0.419 |
| <i>24 h</i> | | | | | | | |
| A. acetico | 46.1 | 45.9 | 45.1 | 46.1 | 0.672 | 0.677 | 0.494 |
| A. propionico | 24.2 | 21.6 | 24.6 | 21.3 | 0.004 | 0.974 | 0.684 |
| A. isobutirrico | 2.28 | 2.47 | 2.11 | 2.34 | 0.325 | 0.490 | 0.914 |
| A. <i>n</i> -butirrico | 19.2 | 19.8 | 18.9 | 19.7 | 0.278 | 0.760 | 0.845 |
| A. isovalerico | 3.85 | 3.99 | 4.36 | 3.81 | 0.457 | 0.540 | 0.221 |
| A. <i>n</i> -valerico | 4.32 | 6.19 | 4.94 | 6.63 | 0.024 | 0.467 | 0.900 |

Tabella 26 - Valori medi relativi alle aree dei picchi cromatografici dei principali composti volatili identificati nei campioni prelevati dopo 24 h di fermentazione nei 4 gruppi sperimentali

| | CTRL | Tannini | Yucca | Tannini + yucca | ANOVA <i>P</i> | | |
|--------------------|---------|---------|---------|--------------------|----------------|-------|--------------------|
| | | | | | Tannini | Yucca | Tannini × yucca |
| Acido solfidrico | 14143 | 5927 | 4953 | 7031 | 0.046 | 0.012 | 0.002 |
| Carbon disolfuro | 59265 | 35099 | 38484 | 38472 | 0.236 | 0.388 | 0.236 |
| Dimetil solfuro | 172375 | 46369 | 50754 | 57407 | 0.102 | 0.127 | 0.072 |
| Disolfuro dimetile | 2448607 | 1569462 | 1224014 | 1727511 | 0.663 | 0.226 | 0.123 |
| 1-butanolo | 1850492 | 2051708 | 3302807 | 2625415 | 0.709 | 0.127 | 0.494 |
| Iso-pentanololo | 1852363 | 1731672 | 2020665 | 2518072 | 0.605 | 0.200 | 0.399 |
| 1-exanololo | 2561443 | 1049363 | 757485 | 803385 | 0.351 | 0.198 | 0.322 |
| Dimetil trisolfuro | 4146557 | 3948041 | 2470641 | 4230345 | 0.519 | 0.569 | 0.421 |
| Fenolo | 222162 | 266519 | 245400 | 337082 | 0.455 | 0.605 | 0.793 |
| <i>p</i> -cresolo | 1166288 | 1851694 | 1190442 | 1739646 | 0.003 | 0.805 | 0.702 |
| Indolo | 5716159 | 4990667 | 5361532 | 5474957 | 0.667 | 0.927 | 0.556 |

Tabella 27 - Popolazioni batteriche determinate nei liquidi di fermentazione dopo 6 e 24 h di incubazione (log copie dsDNA/mL)

| | CTRL | Tannini | Yucca | Tannini + yucca | ANOVA <i>P</i> | | |
|-----------------------------|------|---------|-------|--------------------|----------------|-------|--------------------|
| | | | | | Tannini | Yucca | Tannini × yucca |
| <i>6 h</i> | | | | | | | |
| <i>Lactobacillus</i> spp. | 8.63 | 7.67 | 7.87 | 7.83 | 0.153 | 0.368 | 0.181 |
| <i>Enterococcus</i> spp. | 6.13 | 7.82 | 9.42 | 3.87 | 0.105 | 0.769 | 0.008 |
| <i>Bifidobacterium</i> spp. | 2.70 | 1.51 | 1.09 | 1.60 | 0.154 | 0.160 | 0.119 |
| <i>E. Coli</i> | 8.26 | 7.21 | 7.00 | 7.29 | 0.311 | 0.132 | 0.092 |
| <i>24 h</i> | | | | | | | |
| <i>Lactobacillus</i> spp. | 7.18 | 6.46 | 6.65 | 6.27 | 0.122 | 0.294 | 0.611 |
| <i>Enterococcus</i> spp. | 7.53 | 7.84 | 5.66 | 7.64 | 0.245 | 0.290 | 0.388 |
| <i>Bifidobacterium</i> spp. | 2.39 | 1.39 | 1.46 | 1.16 | 0.228 | 0.278 | 0.512 |
| <i>E. Coli</i> | 6.32 | 5.53 | 5.62 | 5.32 | 0.259 | 0.335 | 0.603 |

8.5 Discussione

I risultati scaturiti dal presente studio hanno condotto ad alcune interessanti osservazioni.

Per quanto concerne le analisi chimiche sui campioni di liquido di fermentazione, l'analisi statistica dei dati raccolti durante la prova ha permesso di evidenziare alcuni effetti derivanti dalla presenza dei due substrati presi in esame, tannini e/o yucca, sul pH. In particolare, è stato possibile rilevare una diminuzione di tale parametro nei campioni contenenti la yucca, prelevati a 6 h. Tale effetto non si sarebbe, tuttavia, mantenuto, ad opera di tale substrato, fino al termine delle 24 ore di prova. Al contrario, un innalzamento del pH, per quanto molto modesto, si è registrato in tutti i campioni contenenti i tannini prelevati alla fine della fermentazione. Se da un lato i risultati sopra menzionati e riguardanti la yucca non risultano associati ad un aumento delle concentrazioni di acidi grassi volatili (i quali risultano, al contrario, significativamente diminuiti negli stessi campioni, ovvero in quelli prelevati a 6 h dall'inizio della prova), i tannini hanno invece evidenziato, accanto all'incremento del pH sopra descritto a 24 h di prova, una contemporanea diminuzione della concentrazione degli acidi grassi volatili totali.

Una diminuzione dei valori di pH a livello intestinale a seguito della somministrazione di substrati indigeribili potrebbe infatti derivare da un incremento della produzione di acidi grassi a corta catena, conseguentemente all'aumento dell'attività fermentativa di origine microbica, così come è già stato osservato nel corso di altri studi condotti *in vitro* in riferimento alle specie d'affezione, a seguito della fermentazione di fibre solubili (Bueno et al., 2000; Sunvold et al., 1995c).

Per quanto concerne la concentrazione dell'ammoniaca nei campioni di liquido di fermentazione, nel presente studio non si sono evidenziati effetti particolari in nessuno dei gruppi sperimentali.

Secondo due studi condotti sui broiler, l'integrazione della dieta con un estratto di *Yucca schidigera* (120 mg/kg di dieta) ha contribuito a ridurre i livelli di ammoniaca all'interno dei ricoveri degli animali (Amon et al., 1997; Cabuk et al., 2004). Al contrario, da prove condotte sul coniglio, ratto e specie avicole è emerso come la somministrazione di *Yucca schidigera* con la dieta non ha avuto alcuna influenza sulle concentrazioni fecali di ammoniaca (Balog et al., 1994; Chrenková

et al., 2012; Killeen et al., 1998a; Preston et al., 1987, 1985). Secondo Hussain et al. (1996), l'estratto di *Yucca schidigera* consente di ridurre le concentrazioni di ammoniaca nel cieco del coniglio, in virtù della presenza di glicosidi terpenici quali saponina e sarsaponina, capaci di legarsi con l'ammoniaca originatasi dalle fermentazioni batteriche intestinali.

In cani e gatti, tuttavia, risultano ad oggi mancanti dati scientifici a testimonianza di una effettiva azione di contenimento di tale composto tossico a livello intestinale da parte di tannini e yucca.

In generale, appare comunque evidente come l'effetto di una sostanza sulla concentrazione di ammoniaca, così come sul pH a livello intestinale, sia influenzato da numerosi fattori, tra cui il tipo di animale valutato (specie ed età), nonché fattori estrinseci a quest'ultimo come la dieta e l'ambiente.

Per quanto riguarda gli effetti sugli acidi grassi volatili, tannini e yucca hanno dimostrato un certo effetto modulatorio sulla concentrazione e sul rapporto di tali composti sui campioni di liquido di fermentazione, con risultati a volte piuttosto difficili da interpretare.

La presenza della yucca ha evidenziato una diminuzione delle concentrazioni di acido acetico, acido *n*-valerico e degli acidi grassi volatili totali dopo 6 ore di fermentazione. Sempre nei campioni relativi a tale tempo di prelievo, per quanto riguarda la composizione percentuale dei singoli acidi grassi volatili sul totale, la yucca ha evidenziato altresì una diminuzione della percentuale di acido *n*-valerico. Per quanto riguarda i tannini, è stata osservata una tendenza alla riduzione dell'acido acetico (14.8 vs. 13.3 mmol/L per CTRL e tannini, rispettivamente; $P = 0.082$) e una riduzione significativa dell'acido propionico (7.09 vs. 6.51 mmol/L per CTRL e tannini, rispettivamente; $P = 0.010$) al termine delle 6 h di fermentazione negli inoculi contenenti il substrato.

Al termine delle 24 h di fermentazione è stato rilevato come la presenza di tannini abbiano portato ad una diminuzione significativa della concentrazione di acido acetico, acido propionico, acido isovalerico e a acidi grassi totali. Quest'ultimo rilievo trova una corrispondenza, peraltro, con il lieve incremento del pH osservato negli inoculi fecali contenenti tannini. È noto come i tannini esercitino un certo effetto inibitore sui batteri produttori di acido acetico (Bravo et al., 1994), a conferma di quanto osservato in questo studio. Tuttavia, da una prova condotta sul ratto è emerso come l'inclusione nella dieta di acido tannico, derivato dall'idrolisi

dei tannini, abbia determinato un incremento delle concentrazioni nel contenuto ciecale di acetato e butirrato, senza influire su quelle di propionato (Barszcz et al., 2011).

I tannini hanno, inoltre, evidenziato un effetto in termini di variazione della composizione percentuale di alcuni acidi grassi sul totale; in particolare, è stata registrata sia a 6 che a 24 ore di fermentazione una diminuzione significativa della percentuale di acido propionico. Dopo 6 ore dall'inizio della prova si è inoltre osservato, sempre nei campioni contenenti i tannini, un incremento della percentuale di acido *n*-butirrico, mentre al termine della fermentazione è stata osservata una tendenza all'aumento della presenza di acido *n*-valerico.

Nel presente studio non è stato possibile rilevare alcun incremento della concentrazione di acido *n*-butirrico da parte di tannini o yucca. Infatti, l'incremento operato dai tannini sulla percentuale di tale molecola rispetto al totale di acidi grassi volatili rilevati a 6 ore di fermentazione non ha realmente alcun significato, in quanto si tratta di una variazione da rapportare al totale degli acidi grassi volatili, che risultano peraltro diminuiti da tale substrato al termine delle 24 h di fermentazione.

La diminuzione di acido acetico, di acido propionico e degli acidi grassi volatili totali riscontrata ad opera dei tannini sui campioni prelevati alle 24 ore di fermentazione e, solo in modo tendenzialmente significativo, su quelli prelevati dopo 6 ore, in termini di concentrazione assoluta, può essere interpretata come conseguenza di un effetto inibitorio sulle attività metaboliche della microflora intestinale. È plausibile pertanto ipotizzare come nel corso della presente fermentazione *in vitro*, i tannini abbiano espresso, anche se solo parzialmente, un'azione antibatterica, la quale si è manifestata, non tanto con una riduzione delle conte batteriche, come verrà discusso di seguito, quanto piuttosto su una riduzione di tali composti organici derivanti dal metabolismo batterico. In letteratura, infatti, esistono numerose evidenze scientifiche a testimonianza degli effetti antibatterici dei composti polifenolici (Akiyama, 2001; Daglia, 2012).

Un altro dato interessante emerso nel corso del presente studio è consistito nella diminuzione ad opera dei tannini della concentrazione dell'acido isovalerico. Coerentemente con quanto da noi osservato, nel corso di uno studio condotto *in vitro* con inoculo ciecale di suinetto è stata osservata una riduzione delle concentrazioni di acido isobutirrico e isovalerico, oltre ad un calo dei livelli di

ammoniaca nel liquido di fermentazione, benché i dosaggi utilizzati fossero di gran lunga superiori a quello impiegato nella presente indagine (Biagi et al., 2010b). Sebbene nel corso del presente studio le concentrazioni di ammoniaca non siano state influenzate da alcun trattamento, questi dati sembrano ad ogni modo suggerire come i tannini siano in grado di limitare le reazioni di tipo proteolitico che hanno luogo nell'intestino crasso degli animali. Tuttavia, nel già citato studio condotto sul ratto, la somministrazione di tannini ha indotto un aumento delle concentrazioni degli acidi grassi a catena ramificata (Barszcz et al., 2011). Le proprietà antinutrizionali dei polifenoli, soprattutto quelle a scapito della matrice proteica, sono ben note: è stato infatti osservato come la presenza nella dieta di tannini riduca significativamente la digeribilità della quota proteica della dieta e incrementi la presenza di sostanze azotate indigerite nel grosso intestino, con conseguente aumento dell'attività proteolitica microbica (Barszcz et al., 2011; Blytt et al., 1988; Liener, 1994).

Nell'ambito del presente studio è stato possibile evidenziare solo una limitata modulazione della composizione della microflora batterica. In particolare, è stata rilevata una tendenziale e modesta riduzione dei lattobacilli operata da parte dei tannini a 24 h di prova. Anche nel già citato studio *in vitro* condotto da Biagi et al. (2010b), l'impiego di un estratto di tannini portò all'evidenza di una significativa diminuzione dei lattobacilli, oltre ad un incremento delle conte di enterococchi e coliformi. Nella successiva prova *in vivo* condotta dagli stessi Autori, tuttavia, l'integrazione con tannini non sortì alcun effetto sulle conte microbiche a livello di contenuto ciecale degli animali. Alcune tipologie di tannini, inoltre, avrebbero manifestato, nell'ambito di studi condotti *in vitro*, un effetto inibitorio nei confronti di *C. perfringens* o di alcune delle sue tossine (Ahn et al., 1998; Elizondo et al., 2010), oltre che su ceppi patogeni di *Staphylococcus aureus* (Ahn et al., 1998), *Helicobacter pylori* (Funatogawa et al., 2004) e di *E. coli* (Yao et al., 2006). Quest'ultimo rilievo, tuttavia, non è stato osservato nel presente studio.

Per quanto riguarda gli effetti della yucca, essa non ha influenzato in alcun modo le popolazioni batteriche prese in esame. In virtù della presenza di saponine, agli estratti di *Yucca schidigera* sono state attribuite proprietà antibatteriche, sia sulle popolazioni dei prestomaci dei ruminanti (Wang et al., 2012) che sulle popolazioni del grosso intestino del suino (Killeen et al., 1998b).

Per quanto riguarda l'effetto decisamente discordante operato dai tannini e dalla yucca sulle popolazioni di enterococchi, così come emerso dall'analisi statistica dei dati, risulta piuttosto difficile attribuire a ciò una spiegazione logica. Tale popolazione batterica, oltretutto, risulta alquanto controversa. A tale genere, appartengono, infatti, sia microorganismi "benefici", usati comunemente nei preparati probiotici disponibili in commercio ad uso umano e veterinario, con evidenze scientifiche a supporto della loro efficacia anche in termini di inibizione nei confronti di batteri patogeni e di miceti produttori di micotossine (Bybee et al., 2011; González-Ortiz et al., 2013; Juri et al., 2013; Vahjen e Männer, 2003), che ceppi responsabili di infezioni a carico di diversi distretti dell'organismo, dotati di un'innata resistenza a diverse classi di antibiotici (Agudelo Higueta e Huycke, 2014). Alla luce di tutto questo, un decremento degli enterococchi operato da substrati, fibrosi e non, di origine alimentare non può necessariamente essere interpretato in modo univocamente negativo o positivo e viceversa.

Nel corso della presente indagine sono stati rilevati numerosi composti volatili nei campioni di liquido di fermentazione esaminati. Fra questi, le 11 molecole selezionate per la successiva analisi statistica, in virtù del loro particolare significato biologico e della loro elevata quantità nei campioni, hanno in parte evidenziato una variazione ad opera dei due substrati considerati.

In particolare, la significativa diminuzione della presenza di acido solfidrico osservata sia in presenza dei tannini, che della yucca (e anche nel caso della loro interazione), oltre al tendenziale contenimento di dimetil solfuro da parte dei tannini, costituiscono effetti certamente positivi sull'habitat intestinale. Infatti, alcuni composti volatili originari dei processi putrefattivi a livello colico ad opera dei batteri solfito-riduttori (Le et al., 2005; Tangerman, 2009) sembrano associati a patologie enteriche quali la colite ulcerativa (Levine et al., 1998; Pitcher e Cummings, 1996) e l'IBD (Roediger et al., 1993); inoltre, sembrano rivestire un ruolo nella sindrome uremica e nella genesi di patologie tumorali a carico di vescica e intestino (Hughes et al., 2000; Muir et al., 1998). Per quanto riguarda le specie d'affezione, uno studio condotto da Lowe e Kershaw (1997) ha messo in luce un miglioramento della consistenza e dell'odore fecale in seguito all'integrazione della dieta di cani e gatti con un estratto di *Yucca schidigera* alla dose giornaliera, rispettivamente, di 250 e 125 mg/kg. I risultati delle analisi dei composti volatili sui campioni fecali raccolti nell'ambito di tale studio, pubblicati da Lowe et al.

(1997), hanno evidenziato, inoltre, come al di là dell'estrema variabilità fra i soggetti, si fosse verificata una diminuzione della concentrazione di metil-solfuro successivamente all'integrazione dietetica con tale substrato. Un altro lavoro condotto sulla specie canina ha confermato la capacità da parte della yucca di contenere del 38% la produzione di acido solfidrico emesso dai soggetti in prova (Giffard et al., 2001).

Per quanto riguarda il fenolo e l'indolo, né i tannini né la yucca hanno evidenziato effetti modulatori su tali componenti, anch'essi derivanti dal metabolismo batterico della tirosina e del triptofano. Anche tali molecole risultano potenzialmente tossiche, in quanto è stato loro riconosciuto un ruolo nell'eziopatogenesi del cancro al colon e alla vescica (Bone et al., 1976; Macfarlane et al., 1986). Per quanto riguarda il *p*-cresolo, derivante come il fenolo, dalla degradazione della tirosina, è stato evidenziato un incremento della molecola negli inoculi fecali contenenti tannini. Tale rilievo non è sicuramente interpretabile in chiave positiva, considerando il ruolo del *p*-cresolo nell'eziopatogenesi della sindrome uremica (Bammens et al., 2006; Meijers et al., 2009).

Alcuni studi riportati in letteratura finalizzati alla valutazione delle proprietà prebiotiche e "anti-proteolitiche" di substrati per lo più di natura fibrosa hanno evidenziato effetti contrastanti sui composti volatili di origine putrefattiva.

In una prova condotta sul gatto è stato osservato come la supplementazione della dieta con FOS comportasse un incremento della concentrazione fecale di 4-metil fenolo, indolo e ammoniaca, con un conseguente incremento dell'intensità dell'odore fecale, verosimilmente attribuibile ad un aumento delle fermentazioni a livello intestinale (Barry et al., 2010). In un precedente studio di Barry et al. (2009) sulla specie canina è stato rilevato come, al contrario, la concentrazione fecale di fenolo diminuisse linearmente con l'aumento dell'integrazione della dieta con inulina, mentre l'indolo non risultasse influenzato dalla presenza del prebiotico.

In numerosi lavori condotti sugli animali d'affezione l'integrazione delle diete con fruttooligosaccaridi non si è rivelata una strategia efficace nel controllare e limitare la produzione di composti volatili fenolici, indolici e di composti solforati maleodoranti (Flickinger et al., 2003a; Hesta et al., 2005; Propst et al., 2003; Swanson et al., 2002b).

Tuttavia, per interpretare tali risultati, a volte apparentemente contrastanti, è necessario tener conto di come non sempre negli studi disponibili in letteratura sia stato possibile identificare i composti volatili in tutti i campioni esaminati, oltre al fatto che sono state avanzate ipotesi su possibili interazioni fra le diverse molecole a livello intestinale, in grado di alterare i risultati (Hesta et al., 2005).

Ad ogni modo, l'impiego di *Yucca schidigera* e tannini quali supplementi alla dieta di cani e gatti trova un certo interesse in virtù delle evidenze scaturite in seguito a prove condotte per lo più su specie di interesse zootecnico, sulla capacità di ridurre la produzione di composti volatili responsabili del cattivo odore delle deiezioni (ammoniaca, acido solfidrico e composti solforati, ad esempio), con un conseguente giovamento in termini di impatto ambientale degli allevamenti (Nazeer et al., 2002).

In definitiva, le evidenze scientifiche disponibili in letteratura, così come i risultati scaturiti dal presente studio, sottolineano la necessità di ulteriori approfondimenti per comprendere meglio i potenziali effetti modulatori sulla microflora intestinale da parte di estratti di *Yucca schidigera* e tannini, con particolare riferimento alle specie d'affezione.

Nel presente studio sono stati previsti dosaggi inferiori dei due substrati rispetto a quelli comunemente impiegati nelle indagini *in vitro* e *in vivo* disponibili in letteratura. Tuttavia, le concentrazioni utilizzate durante la presente prova rispecchiano quelle effettivamente impiegabili nell'alimentazione delle diverse specie animali, in particolare di quelle d'affezione (corrispondenti ad integrazioni nei mangimi pari, al massimo, all'1-2% della dieta), oltre alle quali le conseguenze in termini di appetibilità e digeribilità delle diete non sarebbero tollerabili per la salute e per la corretta gestione alimentare dell'animale.

9 Effetti di dosi crescenti di lattosio sul benessere intestinale del cane

9.1 Materiali e metodi

La prova è stata condotta avvalendosi di 14 cani adulti e in buono stato di salute, regolarmente vaccinati e sottoposti a trattamento antiparassitario (Drontal Plus, Bayer S.p.A., Milano, Italia), di età compresa tra 1 e 5 anni e di peso corporeo medio 20.4 kg. Tutti i soggetti in prova non hanno manifestato problematiche di tipo gastroenterico e non hanno assunto sostanze antibiotiche nell'anno precedente l'inizio della sperimentazione. Gli animali, di proprietà di privati, durante la prova hanno continuato a rimanere sotto le cure del rispettivo proprietario.

Gli animali sono stati alimentati con una dieta commerciale secca estrusa per cani adulti (EffeEffe Petfood S.p.A., Pieve di Porto Morone, Italia; tabella 22). La dieta è stata formulata mediante l'impiego dei seguenti ingredienti: carni disidratate (pollo 25%), riso 15%, granoturco, frumento, grasso animale, farina di aringhe, semi di lino, olio di girasole, ovoprodotti essiccati, sodio fosfato, cloruro di potassio, cloruro di sodio, vitamine e minerali. La dieta non conteneva fonti significative di fibra solubile né tantomeno sostanze prebiotiche in quantità tali da poter nascondere le eventuali differenze tra trattamenti. Quando previsto, la dieta è stata addizionata di livelli crescenti di lattosio alimentare in polvere (lattosio 99% minimo; Brenntag S.p.A., Milano, Italia). Inoltre, la dieta è stata addizionata dello 0.5% di silice colloidale, impiegata come marker indigeribile ai fini della stima della digeribilità dei nutrienti.

Durante i primi 20 giorni (giorni 1-20) dall'inizio della prova gli animali hanno assunto il solo mangime secco senza aggiunta di supplementi. Durante i successivi 60 giorni ciascun animale ha ricevuto dosi crescenti di lattosio a intervalli di 20 giorni ciascuna (0.5 g/d per $\text{kg}^{0.75}$ nei giorni 21-40; 1 g/d per $\text{kg}^{0.75}$ nei giorni 41-60; 2 g/d per $\text{kg}^{0.75}$ nei giorni 61-80). La dose giornaliera di lattosio è stata suddivisa e mescolata equamente per ciascun pasto. La quantità di alimento che ciascun cane ha ricevuto giornalmente è stata calcolata individualmente sulla base dei fabbisogni energetici dell'animale.

I fabbisogni energetici di ciascun cane sono stati calcolati secondo la seguente equazione:

$$\text{kcal al giorno} = 132 \times \text{kg peso corporeo}^{0,75} \text{ (Case et al., 2011)}$$

attribuendo alla dieta, secondo i fattori di Atwater modificati per il cane, 3.5 kcal per grammo di proteine e amido e 8.5 kcal per grammo di lipidi.

Tabella 28 - Composizione chimica della dieta secca commerciale utilizzata nella presente prova

| | % sul tal quale |
|-----------------|-----------------|
| Umidità | 5.34 |
| Proteina grezza | 22.9 |
| Lipidi grezzi | 15.4 |
| Ceneri grezze | 6.9 |
| Fibra grezza | 1.54 |
| Amido | 37.0 |
| Ca | 1.86 |
| P | 3.20 |

9.2 Analisi chimiche e microbiologiche dei campioni

Ciascun proprietario degli animali in prova ha provveduto al prelievo di un campione di feci nei giorni 20, 40, 60 e 80 dall'inizio della somministrazione della dieta. I campioni fecali sono stati raccolti in appositi contenitori sterili e congelati entro 15 min dalla loro escrezione.

Sui campioni di feci sono state svolte le seguenti analisi: pH, sostanza secca, ammoniacca, acidi grassi volatili e determinazione delle principali popolazioni batteriche.

Il pH è stato determinato solubilizzando una quantità nota di campione in acqua distillata (diluizione 1:10 p/v).

Per la determinazione dell'ammoniaca ci si è avvalsi di un apposito kit commerciale (Urea/BUN-Color, BioSystem S.A., Barcellona, Spagna).

Gli acidi grassi volatili sono stati determinati mediante gascromatografia, secondo la metodica descritta da Biagi et al. (2006).

Inoltre, gli ultimi 5 giorni di ciascuna fase sperimentale si è provveduto a raccogliere quotidianamente un campione di feci da destinare alle analisi chimiche per la stima della digeribilità dei nutrienti.

Le analisi chimiche sulla diete e sui campioni fecali sono state condotte seguendo le metodiche standard AOAC (AOAC, 2000; Metodo 954.01 per la proteina grezza, Metodo 920.39 per i lipidi grezzi, Metodo 920.40 per l'amido, Metodo 942.05 per le ceneri grezze). I minerali sono stati determinati mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico.

Il DNA batterico è stato estratto mediante l'uso di un kit commerciale QIAamp DNA Stool Mini-Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germania). La concentrazione (ng/μl) e la purezza del DNA estratto sono state determinate mediante spettrofotometro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA); il DNA genomico è stato quindi diluito (50 ng/μl) e congelato a -20 °C in attesa di successive analisi. Le popolazioni di batteri totali, *Escherichia coli*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. e *Clostridium perfringens* sono state quantificate mediante qPCR e avvalendosi di specifici primer (tabella 23).

L'amplificazione e la quantificazione del DNA genomico è stata eseguita mediante termociclatore CFX96 Touch (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). L'amplificazione è stata eseguita in duplicato per ciascun gruppo batterico; il protocollo è stato ottimizzato per un volume di reazione di 15 μl, contenente 7.5 μl di 2X SensiFAST No-ROX PCR Master Mix (Bioline GmbH, Luckenwalde, Germania), 4.8 μl di acqua priva di nucleasi, 0,6 μl di ciascun primer (concentrazione di 10 pmol) e 1.5 μl di DNA genomico.

Il ciclo di amplificazione è stato il seguente: denaturazione a 95 °C per 2 min, 95 °C for 5 s, appaiamento dei primer a 55–61 °C per 10 s ed estensione a 72 °C per 8 s. Il ciclo è stato ripetuto 40 volte.

Tabella 29 - Popolazioni batteriche oggetto del presente studio

| Target | Primer | Sequenza (5'-3') | Fonte |
|--------------------------------|-----------|--------------------------|-------------------------|
| Batteri totali | FP 16S | GGTAGTCYAYGCMSTAAACG | (Bach et al., 2002) |
| | RP 16S | GACARCCATGCASCACCTG | |
| <i>Lactobacillus</i> spp. | Lab-0159 | GGAAACAG(A/G)TGCTAATACCG | (Collier et al., 2003) |
| | Univ-0515 | ATCGTATTACCGCGGCTGCTGGCA | |
| <i>Enterococcus</i> spp. | Enterof | CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT | (Rinttilä et al., 2004) |
| | Enteror | ACTCGTTGTACTTCCCATTGT | |
| <i>Clostridium perfringens</i> | CP1 | AAAGATGGCATCATCATTCAAC | (Wang et al., 1994) |
| | CP2 | TACCGTCATTATCTTCCCCAAA | |

9.3 Analisi statistica

I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante ANOVA. Un contrasto lineare e quadratico è stato usato per determinare la natura degli effetti di dosi crescenti di lattosio. Le differenze sono state ritenute significative per $P < 0.05$. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite mediante il software Statistica 10.0 (Stat Soft Italia, Padova, Italia).

9.4 Risultati

I valori di umidità e di pH e le concentrazioni di ammoniaca e acidi grassi volatili nelle feci sono riportati in tabella 24. La somministrazione di dosi crescenti di lattosio non ha avuto influenza sui valori di umidità e sui valori di pH fecale ($P > 0.05$). È stata osservata una tendenza lineare ($P = 0.094$) alla riduzione delle concentrazioni di ammoniaca nelle feci al crescere della percentuale di inclusione di lattosio (da 40.80 a 33.94 mmol/g per 0 e 2 g/d per $\text{kg}^{0.75}$ di lattosio, rispettivamente). I rapporti di acido isovalerico sono stati ridotti in modo lineare dalla presenza di lattosio (da 2.72 a 1.46% per 0 e 2 g/d per $\text{kg}^{0.75}$ di lattosio, rispettivamente; $P < 0.05$), mentre le concentrazioni degli altri acidi grassi volatili non sono state influenzate dai trattamenti ($P > 0.05$).

La tabella 25 riporta i valori di digeribilità apparente dei macronutrienti, macrominerali ed oligoelementi della dieta secca commerciale. Non sono state

osservate differenze sui valori di digeribilità in seguito alla somministrazione di dosi crescenti di lattosio ($P > 0.05$).

I dati relativi alla numerosità dei batteri totali e delle popolazioni batteriche prese in esame sono riportati in tabella 26. L'inclusione di dosi crescenti di lattosio non ha avuto alcun effetto sulle popolazioni batteriche dei campioni fecali dei soggetti in prova ($P > 0.05$).

Tabella 30 - Valori di umidità, pH e concentrazioni di ammoniaca e acidi grassi volatili nei campioni fecali

| | Lattosio (g/d per kg ^{0.75}) | | | | ANOVA <i>P</i> | Contrasto, <i>P</i> | |
|---------------------------|--|-------|-------|-------|----------------|---------------------|------------|
| | 0 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | | lineare | quadratico |
| Umidità, % | 64.8 | 65.7 | 67.07 | 65.5 | 0.10 | 0.210 | 0.068 |
| pH | 6.69 | 6.74 | 6.60 | 6.46 | 0.34 | 0.109 | 0.400 |
| NH ₃ , mmol/g | 40.80 | 37.67 | 35.49 | 33.94 | 0.39 | 0.094 | 0.790 |
| A. acetico, % | 54.96 | 55.68 | 53.03 | 53.62 | 0.66 | 0.381 | 0.967 |
| A. propionico, % | 28.60 | 27.73 | 29.54 | 31.52 | 0.83 | 0.434 | 0.637 |
| A. <i>n</i> -butirrico, % | 11.40 | 9.44 | 12.86 | 9.47 | 0.24 | 0.696 | 0.596 |
| A. isobutirrico, % | 1.78 | 3.52 | 2.18 | 3.86 | 0.39 | 0.282 | 0.978 |
| A. <i>n</i> -valerico, % | 0.52 | 0.65 | 0.35 | 0.04 | 0.18 | 0.061 | 0.275 |
| A. isovalerico, % | 2.72 | 2.95 | 2.01 | 1.46 | 0.15 | 0.039 | 0.436 |
| AGV totali, mmol/g | 145 | 145 | 135 | 143 | 0.95 | 0.812 | 0.775 |

Tabella 31 - Valori di digeribilità apparente dei macronutrienti, macrominerali ed oligoelementi (%)

| | Lattosio (g/d per kg ^{0.75}) | | | | ANOVA <i>P</i> | Contrasto, <i>P</i> | |
|-----------------|--|-------|-------|-------|----------------|---------------------|------------|
| | 0 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | | lineare | quadratico |
| Sostanza secca | 86.04 | 87.66 | 86.90 | 84.97 | 0.41 | 0.430 | 0.128 |
| Proteine grezze | 86.33 | 87.61 | 86.54 | 84.35 | 0.43 | 0.239 | 0.203 |
| Ceneri grezze | 46.81 | 53.31 | 51.25 | 44.16 | 0.45 | 0.601 | 0.128 |
| Lipidi grezzi | 98.00 | 98.29 | 97.99 | 97.69 | 0.66 | 0.389 | 0.375 |
| Ca | 36.16 | 46.90 | 44.20 | 36.04 | 0.30 | 0.892 | 0.073 |
| P | 84.47 | 86.80 | 86.14 | 85.33 | 0.49 | 0.722 | 0.213 |
| Na | 95.79 | 95.94 | 96.21 | 96.24 | 0.92 | 0.515 | 0.911 |
| K | 92.30 | 93.12 | 92.79 | 91.98 | 0.71 | 0.696 | 0.283 |
| Zn | 28.75 | 41.23 | 38.97 | 30.80 | 0.29 | 0.875 | 0.077 |
| Mn | 94.34 | 94.72 | 94.88 | 93.82 | 0.18 | 0.347 | 0.041 |
| Fe | -2.90 | 4.39 | 1.85 | -9.24 | 0.33 | 0.361 | 0.094 |
| Cu | 51.90 | 58.43 | 52.60 | 45.99 | 0.70 | 0.455 | 0.366 |

Tabella 32 - Batteri totali e popolazioni batteriche oggetto del presente studio (log copie dsDNA/g di feci)

| | Lattosio (g/d per kg ^{0.75}) | | | | ANOVA <i>P</i> | Contrasto, <i>P</i> | |
|--------------------------------|--|------|------|------|----------------|---------------------|------------|
| | 0 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | | lineare | quadratico |
| Batteri totali | 6.23 | 6.72 | 6.29 | 6.35 | 0.81 | 0.967 | 0.602 |
| <i>Lactobacillus</i> spp. | 5.89 | 5.49 | 5.79 | 5.43 | 0.86 | 0.602 | 0.956 |
| <i>Enterococcus</i> spp. | 5.62 | 5.77 | 5.77 | 5.77 | 0.56 | 0.509 | 0.783 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 6.29 | 6.83 | 5.98 | 6.28 | 0.45 | 0.610 | 0.749 |

9.5 Discussione

Su un totale di 14 animali inizialmente partecipanti alla prova, 4 cani sono stati esclusi poiché hanno rifiutato l'assunzione della dieta contenente la polvere di lattosio, 2 soggetti sono stati esclusi subito dopo la prima assunzione del secondo dosaggio di lattosio (1 g/d per kg^{0.75}) poiché hanno immediatamente manifestato episodi acuti di diarrea acquosa, mentre i restanti 8 soggetti sono giunti al termine della sperimentazione assumendo sino all'ultima dose di lattosio prevista e senza manifestare alcuna problematica di tipo gastrointestinale.

Il siero di latte è il principale sottoprodotto dell'industria casearia e consiste di ciò che residua del latte dopo che da esso sono state allontanate sia la componente lipidica sia la caseina. Il siero di latte viene in parte utilizzato fresco nell'alimentazione dei suini e in parte disidratato per ottenere la cosiddetta farina di siero di latte o siero di latte in polvere. La farina di siero di latte in polvere è costituita principalmente da lattosio (70-75%) e contiene circa il 10-13% di proteine e l'8% di minerali. L'impiego di siero di latte in polvere da parte delle aziende che producono alimenti per animali da compagnia potrebbe essere di notevole interesse, in ragione delle caratteristiche organolettiche di questo alimento, delle sue potenziali proprietà prebiotiche attribuibili all'abbondanza di lattosio e di un costo relativamente contenuto.

Il lattosio è un disaccaride che i mammiferi digeriscono mediante la produzione in sede intestinale di uno specifico enzima denominato lattasi. È però ben noto come in tutti i mammiferi l'attività lattasica sia forte nel periodo neonatale per poi declinare progressivamente sino al raggiungimento dell'età adulta. Ciononostante, in molte persone adulte, sebbene con forti differenze su base etnica e geografica (Mattar et al., 2012; Vuorisalo et al., 2012), permane una certa produzione di lattasi intestinale tale da permettere l'assunzione di latte vaccino e latticini freschi senza ciò comporti alcun disturbo. Viceversa, nei soggetti che perdono completamente la capacità di produrre lattasi (individui lattosio-intolleranti) l'assunzione di quantità significative di lattosio con la dieta determina la comparsa di disturbi gastrointestinali legati principalmente all'azione osmotica svolta in intestino dal lattosio indigerito.

Peraltro, è stato dimostrato, nell'uomo (Szilagyi et al., 2010) come in altre specie animali (Tran et al., 2012), che il lattosio indigerito che raggiunge l'intestino crasso

può svolgere in questa sede un'azione di tipo prebiotico, andando a stimolare il metabolismo e la moltiplicazione di specie batteri considerate benefiche quali lattobacilli e bifidobatteri. Non a caso, nell'alimentazione dei volatili (animali naturalmente privi di lattasi) il lattosio è spesso impiegato come supplemento ad azione prebiotica (Totton et al., 2012). Quando assunto in dosi modeste il lattosio può esercitare una azione benefica a livello intestinale; viceversa, se assunto in quantità più elevate, ha un effetto lassativo la cui intensità dipende dalla quantità assunta. Mentre la problematica legata alla tolleranza al lattosio nell'uomo è stata oggetto di numerosi studi (Lomer, 2015), ben poco o quasi nulla si sa di ciò che avviene nel cane adulto. Due Autori hanno in passato proposto una soglia di tolleranza del lattosio nel cane adulto pari a 1-2 g di lattosio al giorno per kg di peso corporeo dell'animale (Meyer e Zentek, 1998). In uno studio condotto da Zentek et al. (2002b), la somministrazione di lattosio a cani adulti alla dose giornaliera di 1 g per kg di peso corporeo non ha avuto alcuna influenza sulla qualità delle feci.

In questo studio, 4 soggetti su 14 partecipanti alla prova hanno rifiutato l'assunzione della dieta una volta che il lattosio era stato aggiunto, nonostante l'apparente sapore dolce e odore gradevole dello zucchero. Nel lavoro di Zentek et al. (2002b) gli Autori non hanno riportato di nessun soggetto riluttante verso l'assunzione di lattosio, seppur aggiunto in dosi maggiori. In questa prova, il rifiuto al consumo del disaccaride potrebbe essere dovuto, oltre che alle preferenze organolettiche di ciascun animale, al peggioramento della palatabilità della dieta secca riconducibili alla polverulenza conferita dal lattosio.

Durante il corso della prova, 2 cani riceventi lattosio (1 g/d per $\text{kg}^{0.75}$) hanno manifestato episodi acuti di diarrea acquosa nelle 24 h successive l'assunzione dello zucchero; al contrario, Zentek et al. (2002b) non hanno osservato nessun effetto gastroenterico o sull'umidità delle feci dei soggetti in prova, sebbene questi ricevessero un dosaggio più elevato di lattosio (1 g/d per kg di peso corporeo). Nei restanti soggetti partecipanti a questa prova, l'inclusione nella dieta di lattosio, anche al più alto dosaggio previsto (2 g/d per $\text{kg}^{0.75}$), non ha avuto alcun effetto sui valori di umidità e sui valori di pH fecale, analogamente a quanto osservato da Zentek et al. (2002b).

La tendenza lineare ($P = 0.094$) alla riduzione delle concentrazioni di ammoniaca nelle feci al crescere della percentuale di inclusione di lattosio potrebbe far presumere una certa riduzione dell'attività catabolica delle popolazioni proteolitiche batteriche. Una diminuzione delle concentrazioni di ammoniaca indotta dalla presenza di lattosio è stata osservata nell'uomo *in vitro* (Uribe-Esquivel et al., 1997; Vince e Burridge, 1980) ma non *in vivo* nel lavoro condotto da Zentek et al. (2002b) su cani adulti.

La riduzione delle concentrazioni fecali di acido isovalerico osservate in concomitanza all'assunzione di dosi crescenti di lattosio può, come già osservato per la riduzione delle concentrazioni di ammoniaca, essere ricollegata ad una riduzione dell'attività proteolitica intestinale. La propensione del lattosio a inibire le fermentazioni putrefattive in intestino riducendo le concentrazioni fecali di acidi grassi a catena ramificata è stata osservata nel suino da diversi Autori (Pierce et al., 2006a, 2006b). Sempre nel suino, l'inclusione di lattosio (215 g/kg di dieta) in diete ad alto contenuto in proteina (210 g/kg di dieta) ha contribuito a mitigare l'aumento delle concentrazioni fecali di acido isobutirrico e acido isovalerico, incrementando quelle di butirrico (Pierce et al., 2007). Tuttavia, in questa prova, le concentrazioni degli altri acidi grassi volatili non hanno risentito della presenza del lattosio, analogamente a quanto osservato da Zentek et al. (2002b).

I valori di digeribilità apparente dei macronutrienti, macrominerali ed oligoelementi della dieta secca commerciale non sono stati influenzati dalla somministrazione di dosi crescenti di lattosio, similmente a quanto riportato in un precedente studio (Zentek et al., 2002b). Nel suino, la somministrazione di elevati quantitativi di lattosio ha indotto un miglioramento della digeribilità apparente della sostanza secca, sostanza organica, proteina grezza e della fibra neutro detersa (Pierce et al., 2007), mentre in un precedente studio la supplementazione della dieta con lattosio, seppure a livelli inferiori (112 g/kg di dieta) ha determinato un peggioramento della digeribilità proteica e un aumento dell'escrezione fecale di azoto. Una aumentata quota di azoto escreto con le feci è sinonimo di un incremento della sintesi proteica e quindi della crescita batterica, e/o di una maggiore perdita di proteine endogene (Rideout et al., 2004; van der Meulen et al., 1997). Tuttavia, in questo studio non sono state osservate differenze riguardo i coefficienti di digeribilità della proteina grezza in seguito all'inclusione di lattosio,

così come non sono state osservate differenze sulla composizione del microbiota fecale dei soggetti in prova. In uno studio condotto su pazienti lattosio-intolleranti, rispetto a soggetti digerenti il lattosio è stato osservato un incremento delle popolazioni di bifidobatteri e una tendenza all'aumento delle conte fecali di lattobacilli in seguito all'assunzione di una dieta contenente lo zucchero (Szilagy et al., 2010). Le proprietà del lattosio di stimolare la crescita delle popolazioni di bifidobatteri e lattobacilli è stata osservata anche in un esperimento *in vitro* condotto da Mäkivuokko et al. (2006). Qualora l'attività lattasica nel piccolo intestino fosse insufficiente a idrolizzare tutta la quota di lattosio assunta con la dieta, la frazione residua di disaccaride raggiunge il colon dove è idrolizzata dalla β -galattosidasi batterica in glucosio e galattosio. Nell'uomo, l'attività di questo enzima è piuttosto importante nel grosso intestino in quanto circa l'80% delle specie batteriche fecali coltivabili posseggono la capacità di produrre β -galattosidasi (He et al., 2008, 2005). Nel complesso, i risultati ottenuti nel presente esperimento potrebbero suggerire come la supplementazione delle diete con lattosio, nonostante sia stata osservata una riduzione dei parametri indicatori di proteolisi, non abbia avuto particolari effetti di tipo prebiotico nei confronti delle popolazioni batteriche prese in esame degli animali partecipanti alla prova. Una regolare assunzione di lattosio dovrebbe infatti influenzare la composizione del microbiota del grosso intestino, stimolando in particolare la crescita di bifidobatteri e lattobacilli, tra i principali utilizzatori di lattosio (Ito e Kimura, 1993). Nonostante le quantità di lattosio assunte dai soggetti in prova fossero tutt'altro che trascurabili, i risultati ottenuti fanno supporre come perfino nel cane la capacità di produrre lattasi possa protrarsi anche in età adulta. Tuttavia, non è noto se gli animali partecipanti alla prova fossero abituati a ricevere nella loro dieta latticini o altre fonti alimentari di lattosio, che potrebbero aver contribuito a stimolare e mantenere nel tempo una certa produzione di lattasi.

10 Conclusioni

Dall'insieme dei risultati conseguiti nel corso delle ricerche effettuate, sono emerse le conclusioni riportate qui di seguito.

Valutazione delle proprietà funzionali di sostanze prebiotiche in presenza di diete differenti per qualità e quantità della frazione proteica nel cane e nel gatto.

I risultati ottenuti nel corso delle tre indagini condotte in tale ambito hanno confermato l'elevata variabilità, sia interspecifica che intraspecifica, del microbiota intestinale del cane e del gatto.

Gli studi condotti nella specie felina (capitolo 5) e in quella canina (capitolo 6) hanno evidenziato nell'insieme, a seguito della presenza di sostanze prebiotiche negli inoculi fecali, effetti positivi sulla composizione e metabolismo della microflora intestinale, riducendo l'attività proteolitica batterica e incrementando le concentrazioni di acidi grassi volatili.

Dalla prova condotta *in vivo* sul cane (capitolo 7) è emerso come, nonostante non sia stata osservata nessuna influenza sulle popolazioni batteriche prese in esame in seguito alla somministrazione di fruttooligosaccaridi, l'acidificazione dell'ambiente enterico conseguente all'aumentata attività fermentativa batterica promossa dal prebiotico abbia determinato drasticamente un aumento della digeribilità delle sostanze minerali assunte con la dieta.

È emerso, inoltre, come l'impiego di diete ricche di proteine, tanto più se poco digeribili, possa avere conseguenze negative sull'ambiente intestinale, come una riduzione dell'umidità delle feci e l'aumento delle concentrazioni di ammoniaca fecale. Tuttavia, sulla base dei dati ottenuti nel corso delle tre prove, è risultato come la presenza di oligosaccaridi non sembra contrastare gli effetti negativi che diete ad alto tenore proteico potrebbero avere sull'ecosistema intestinale dell'animale.

Valutazione *in vitro* degli effetti di un estratto a base di tannini e di *Yucca schidigera* sul microbiota intestinale del gatto.

Entrambi i substrati hanno avuto influenza sul metabolismo della microflora intestinale del gatto, andando ad alterare le concentrazioni degli acidi grassi volatili negli inoculi fecali. I tannini, ed in particolar modo la yucca, si sono dimostrati efficaci nel contenere la produzione di sostanze maleodoranti quali l'acido solfidrico; tuttavia, un aumento del *p*-cresolo, catabolita originante dalle fermentazioni proteolitiche e implicato nella patogenesi di alcune patologie del tratto enterico, è stato associato alla presenza di tannini. Nonostante siano necessari ulteriori studi, i risultati ottenuti nel corso della presente sperimentazione hanno mostrato come l'inclusione nella dieta di estratti di *Yucca schidigera* e tannini possa contribuire a mitigare l'emanazione di sostanze maleodoranti dalle deiezioni degli animali da compagnia.

Effetti di dosi crescenti di lattosio sul benessere intestinale del cane.

I risultati ottenuti nel presente esperimento potrebbero suggerire come la supplementazione delle diete con lattosio, nonostante sia stata osservata una riduzione dei parametri indicatori di proteolisi, non abbia avuto particolari effetti di tipo prebiotico nei confronti delle popolazioni batteriche prese in esame dei soggetti partecipanti alla prova. Nonostante le quantità di lattosio assunte dai soggetti in prova fossero tutt'altro che trascurabili, i risultati ottenuti fanno supporre come perfino nel cane la capacità di produrre lattasi possa protrarsi anche in età adulta. Nonostante siano necessari ulteriori studi per valutare l'efficacia del lattosio come supplemento prebiotico, l'impiego di siero di latte in polvere da parte delle aziende che producono alimenti per animali da compagnia potrebbe essere di notevole interesse, in ragione delle caratteristiche organolettiche di questo alimento, delle sue potenziali proprietà prebiotiche attribuibili all'abbondanza di lattosio e di un costo relativamente contenuto.

La necessità di condurre ulteriori approfondimenti in merito all'utilizzo di sostanze cosiddette "funzionali" nell'alimentazione del cane e del gatto trova un perfetto riscontro nelle attuali esigenze dei proprietari di animali da compagnia e del settore industriale del petfood. Il miglioramento qualitativo degli alimenti preparati destinati agli animali da compagnia, infatti, comprende importanti

accezioni in termini di appetibilità, qualità delle materie prime e modulazione “funzionale”. Infatti, è stato dimostrato come l’inclusione nella dieta di alimenti funzionali, in particolar modo di sostanze prebiotiche, sia in grado di esercitare, in rapporto alla loro composizione, una grande influenza sulle condizioni trofico-sanitarie dell’apparato digerente e, conseguentemente, sullo stato di benessere generale dell’animale.

11 Bibliografia

- Agudelo Higueta, N., Huycke, M., 2014. Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston.
- Ahmed, I., Greenwood, R., Costello, B. de L., Ratcliffe, N.M., Probert, C.S., 2013. An investigation of fecal volatile organic metabolites in irritable bowel syndrome. *PLoS One* 8, e58204.
- Ahn, Y.-J., Lee, C.-O., Kweon, J.-H., Ahn, J.-W., Park, J.-H., 1998. Growth-inhibitory effects of *Galla Rhois*-derived tannins on intestinal bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 84, 439–443.
- Akiyama, H., 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 487–491.
- Allison, C., Macfarlane, G.T., 1989. Influence of pH, nutrient availability, and growth rate on amine production by *Bacteroides fragilis* and *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2894–2898.
- Amon, M., Dobeic, M., Sneath, R.W., Phillips, V.R., Misselbrook, T.H., Pain, B.F., 1997. A farm-scale study on the use of clinoptilolite zeolite and De-Odorase® for reducing odour and ammonia emissions from broiler houses. *Bioresour. Technol.* 61, 229–237.
- Attene-Ramos, M.S., Nava, G.M., Muellner, M.G., Wagner, E.D., Plewa, M.J., Gaskins, H.R., 2010. DNA damage and toxicogenomic analyses of hydrogen sulfide in human intestinal epithelial FHs 74 Int cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 51, 304–14.
- Attene-Ramos, M.S., Wagner, E.D., Gaskins, H.R., Plewa, M.J., 2007. Hydrogen sulfide induces direct radical-associated DNA damage. *Mol. Cancer Res.* 5, 455–459.
- Aumiller, T., Mosenthin, R., Weiss, E., 2015. Potential of cereal grains and grain legumes in modulating pigs' intestinal microbiota – A review. *Livest. Sci.* 172, 16–32.
- Awano, N., Wada, M., Mori, H., Nakamori, S., Takagi, H., 2005. Identification and functional analysis of *Escherichia coli* cysteine desulhydrases. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4149–4152.
- Bach, H., Tomanova, J., Schloter, M., Munch, J., 2002. Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *J. Microbiol. Methods* 49, 235–245.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V, Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I., 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15718–15723.

- Baglieri, A., Mahe, S., Zidi, S., Huneau, J.-F., Thuillier, F., Marteau, P., Tome, D., 2007. Gastro-jejunal digestion of soya-bean-milk protein in humans. *Br. J. Nutr.* 72, 519–532.
- Bajka, B.H., Clarke, J.M., Cobiac, L., Topping, D.L., 2008. Butyrylated starch protects colonocyte DNA against dietary protein-induced damage in rats. *Carcinogenesis* 29, 2169–2174.
- Balog, J.M., Anthony, N.B., Wall, C.W., Walker, R.D., Rath, N.C., Huff, W.E., 1994. Effect of a Urease Inhibitor and Ceiling Fans on Ascites in Broilers.: 2. Blood Variables, Ascites Scores, and Body and Organ Weights. *Poult. Sci.* 73, 810–816.
- Bammens, B., Evenepoel, P., Keuleers, H., Verbeke, K., Vanrenterghem, Y., 2006. Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 69, 1081–1087.
- Barker, H.A., 1981. Amino acid degradation by anaerobic bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 23–40.
- Barry, K.A., Hernot, D.C., Middelbos, I.S., Francis, C., Dunsford, B., Swanson, K.S., Fahey, G.C., 2009. Low-level fructan supplementation of dogs enhances nutrient digestion and modifies stool metabolite concentrations, but does not alter fecal microbiota populations. *J. Anim. Sci.* 87, 3244–3252.
- Barry, K.A., Middelbos, I.S., Vester Boler, B.M., Dowd, S.E., Suchodolski, J.S., Henrissat, B., Coutinho, P.M., White, B.A., Fahey, G.C., Swanson, K.S., 2012. Effects of dietary fiber on the feline gastrointestinal metagenome. *J. Proteome Res.* 11, 5924–5933.
- Barry, K.A., Wojcicki, B.J., Middelbos, I.S., Vester, B.M., Swanson, K.S., Fahey, G.C., 2010. Dietary cellulose, fructooligosaccharides, and pectin modify fecal protein catabolites and microbial populations in adult cats. *J. Anim. Sci.* 88, 2978–1987.
- Barszcz, M., Taciak, M., Skomial, J., 2011. A dose-response effects of tannic acid and protein on growth performance, caecal fermentation, colon morphology, and β -glucuronidase activity of rats. *J. Anim. Feed Sci.* 20, 613–625.
- Beloshapka, A.N., Dowd, S.E., Suchodolski, J.S., Steiner, J.M., Duclos, L., Swanson, K.S., 2013. Fecal microbial communities of healthy adult dogs fed raw meat-based diets with or without inulin or yeast cell wall extracts as assessed by 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 84, 532–541.
- Beloshapka, A.N., Duclos, L.M., Vester Boler, B.M., Swanson, K.S., 2012a. Effects of inulin or yeast cell-wall extract on nutrient digestibility, fecal fermentative end-product concentrations, and blood metabolite concentrations in adult dogs fed raw meat-based diets. *Am. J. Vet. Res.* 73, 1016–1023.

- Beloshapka, A.N., Wolff, A.K., Swanson, K.S., 2012b. Effects of feeding polydextrose on faecal characteristics, microbiota and fermentative end products in healthy adult dogs. *Br. J. Nutr.* 108, 638–644.
- Benno, Y., Nakao, H., Uchida, K., Mitsuoka, T., 1992. Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of beagle dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 54, 703–706.
- Bermingham, E.N., Young, W., Kittelmann, S., Kerr, K.R., Swanson, K.S., Roy, N.C., Thomas, D.G., 2013. Dietary format alters fecal bacterial populations in the domestic cat (*Felis catus*). *Microbiologyopen* 2, 173–81.
- Bernalier-Donadille, A., 2010. Fermentative metabolism by the human gut microbiota. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 34, S16–22.
- Beynen, A.C., Baas, J.C., Hoekemeijer, P.E., Kappert, H.J., Bakker, M.H., Koopman, J.P., Lemmens, A.G., 2002. Faecal bacterial profile, nitrogen excretion and mineral absorption in healthy dogs fed supplemental oligofructose. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 86, 298–305.
- Beynen, A.C., Kappert, H.J., Yu, S., 2001. Dietary lactulose decreases apparent nitrogen absorption and increases apparent calcium and magnesium absorption in healthy dogs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 85, 67–72.
- Biagi, G., Cipollini, I., Bonaldo, A., Grandi, M., Pompei, A., Stefanelli, C., Zaghini, G., 2013. Effect of feeding a selected combination of galacto-oligosaccharides and a strain of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* on the intestinal microbiota of cats. *Am. J. Vet. Res.* 74, 90–95.
- Biagi, G., Cipollini, I., Grandi, M., Zaghini, G., 2010a. Influence of some potential prebiotics and fibre-rich foodstuffs on composition and activity of canine intestinal microbiota. *Anim. Feed Sci. Technol.* 159, 50–58.
- Biagi, G., Cipollini, I., Paulicks, B.R., Roth, F.X., 2010b. Effect of tannins on growth performance and intestinal ecosystem in weaned piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 64, 121–135.
- Biagi, G., Piva, A., Moschini, M., Vezzali, E., Roth, F.X., 2006. Effect of gluconic acid on piglet growth performance, intestinal microflora, and intestinal wall morphology. *J. Anim. Sci.* 84, 370–378.
- Blachier, F., Selamnia, M., Robert, V., M'Rabet-Touil, H., Duée, P.-H., 1995. Metabolism of l-arginine through polyamine and nitric oxide synthase pathways in proliferative or differentiated human colon carcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1268, 255–262.
- Blytt, H.J., Guscar, T.K., Butler, L.G., 1988. Antinutritional effects and ecological significance of dietary condensed tannins may not be due to binding and inhibiting digestive enzymes. *J. Chem. Ecol.* 14, 1455–1465.

- Bone, E., Tamm, A., Hill, M., 1976. The production of urinary phenols by gut bacteria and their possible role in the causation of large bowel cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 29, 1448–1454.
- Bos, C., Juillet, B., Fouillet, H., Turlan, L., Daré, S., Luengo, C., N'tounda, R., Benamouzig, R., Gausserès, N., Tomé, D., Gaudichon, C., 2005. Postprandial metabolic utilization of wheat protein in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 87–94.
- Bravo, L., Abia, R., Eastwood, M.A., Saura-Calixtol, F., 1994. Degradation of polyphenols (catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic fermentation and faecal output. *Br. J. Nutr.* 71, 933–946.
- Brosey, B.P., Hill, R.C., Scott, K.C., 2000. Gastrointestinal volatile fatty acid concentrations and pH in cats. *Am. J. Vet. Res.* 61, 359–361.
- Buddington, R.K., 2003. Postnatal changes in bacterial populations in the gastrointestinal tract of dogs. *Am. J. Vet. Res.* 64, 646–651.
- Bueno, A.R., Cappel, T.G., Sunvold, G.D., Moxley, R.A., Reinhart, G.A., Clemens, E.T., 2000. Feline colonic microbes and fatty acid transport: Effects of feeding cellulose, beet pulp and pectin/gum arabic fibers. *Nutr. Res.* 20, 1319–1328.
- Butterworth, R.F., 2003. Role of circulating neurotoxins in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: Potential for improvement following their removal by liver assist devices. *Liver Int.* 23, 5–9.
- Bybee, S.N., Scorza, A. V, Lappin, M.R., 2011. Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on presence of diarrhea in cats and dogs housed in an animal shelter. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 856–860.
- Cabuk, M., Alcicek, A., Bozkurt, M., Akkan, S., 2004. Effect of *Yucca schidigera* and Natural Zeolite on Broiler Performance. *Int. J. Poult. Sci.* 3, 651–654.
- Case, L.P., Daristotle, L., Hayek, M.G., Raasch, M.F., 2011. *Canine and Feline Nutrition: A Resource for Companion Animal Professionals*. Mosby Elsevier.
- Cerf-Bensussan, N., Gaboriau-Routhiau, V., 2010. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat. Rev. Immunol.* 10, 735–744.
- Chapman, M.A.S., Grahn, M.F., Hutton, M., Williams, N.S., 1995. Butyrate metabolism in the terminal ileal mucosa of patients with ulcerative colitis. *Br. J. Surg.* 82, 36–38.
- Charney, A.N., Giannella, R.A., Egnor, R.W., 1999. Effect of short-chain fatty acids on cyclic 3',5'-guanosine monophosphate-mediated colonic secretion. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 124, 169–178.
- Chrenková, M., Chrastinová, L., Poláčiková, M., Formelová, Z., Baláži, A., Ondruška, L., Sirotkin, A., Chrenek, P., 2012. The effect of *Yucca schidigera*

- extract in diet of rabbits on nutrient digestibility and qualitative parameters in caecum. *Slovak J. Anim. Sci.* 45, 83–88.
- Collier, C.T., Smiricky-Tjardes, M.R., Albin, D.M., Wubben, J.E., Gabert, V.M., Deplancke, B., Bane, D., Anderson, D.B., Gaskins, H.R., 2003. Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters. *J Anim Sci* 81, 3035–3045.
- Condezo-Hoyos, L., Mohanty, I.P., Noratto, G.D., 2014. Assessing non-digestible compounds in apple cultivars and their potential as modulators of obese faecal microbiota in vitro. *Food Chem.* 161, 208–215.
- Cramer, K.R., Greenwood, M.W., Moritz, J.S., Beyer, R.S., Parsons, C.M., 2007. Protein quality of various raw and rendered by-product meals commonly incorporated into companion animal diets. *J. Anim. Sci.* 85, 3285–3293.
- Cremin, J.D., Fitch, M.D., Fleming, S.E., 2003. Glucose alleviates ammonia-induced inhibition of short-chain fatty acid metabolism in rat colonic epithelial cells. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G105 – G114.
- Cummings, J.H., Englyst, H.N., 1987. Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *Am. J. Clin. Nutr.* 45, 1243 – 1255.
- Cummings, J.H., Macfarlane, G.T., 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.* 70, 443–459.
- Cummings, J.H., Stephen, A.M., 2007. Carbohydrate terminology and classification. *Eur. J. Clin. Nutr.* 61 Suppl 1, S5–18.
- Dagher, P.C., Egnor, R.W., Taglietta-Kohlbrecher, A., Charney, A.N., 1996. Short-chain fatty acids inhibit cAMP-mediated chloride secretion in rat colon. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 271, C1853–C1860.
- Daglia, M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 174–181.
- Dai, Z., Wu, G., Zhu, W., 2011. Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health. *Front. Biosci.* 16, 1768 – 1786.
- Darcy-Vrillon, B., Cherbuy, C., Morel, M.-T., Durand, M., Duee, P.-H., 1996. Short chain fatty acid and glucose metabolism in isolated pig colonocytes: modulation by NH₄⁺. *Mol. Cell. Biochem.* 156, 145–151.
- Davila, A.-M., Blachier, F., Gotteland, M., Andriamihaja, M., Benetti, P.-H., Sanz, Y., Tomé, D., 2013. Intestinal luminal nitrogen metabolism: role of the gut microbiota and consequences for the host. *Pharmacol. Res.* 68, 95–107.
- De Godoy, M.R.C., Kerr, K.R., Fahey, G.C., 2013. Alternative dietary fiber sources in companion animal nutrition. *Nutrients* 5, 3099–3117.

- De LeBlanc, A. de M., Castillo, N.A., Perdigon, G., 2010. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Int. J. Food Microbiol.* 138, 223–231.
- Delzenne, N.M., Roberfroid, M.R., 1994. Physiological Effects of Non-Digestible Oligosaccharides. *Food Sci. Technol.* 27, 1–6.
- Deng, P., Swanson, K.S., 2014. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. *Br. J. Nutr.* 1–12.
- Depauw, S., Bosch, G., Hesta, M., Whitehouse-Tedd, K., Hendriks, W.H., Kaandorp, J., Janssens, G.P.J., 2012. Fermentation of animal components in strict carnivores: a comparative study with cheetah fecal inoculum. *J. Anim. Sci.* 90, 2540–8.
- Desai, A.R., Musil, K.M., Carr, A.P., Hill, J.E., 2009. Characterization and quantification of feline fecal microbiota using cpn60 sequence-based methods and investigation of animal-to-animal variation in microbial population structure. *Vet. Microbiol.* 137, 120–128.
- Di Martino, M.L., Campilongo, R., Casalino, M., Micheli, G., Colonna, B., Prosseda, G., 2013. Polyamines: emerging players in bacteria-host interactions. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 484–491.
- Diener, M., Helmle-Kolb, C., Murer, H., Scharrer, E., 1993. Effect of short-chain fatty acids on cell volume and intracellular pH in rat distal colon. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 424, 216–223.
- Diez, M., Hornick, J.L., Baldwin, P., Istasse, L., 1997. Influence of a blend of fructo-oligosaccharides and sugar beet fiber on nutrient digestibility and plasma metabolite concentrations in healthy Beagles. *Am. J. Vet. Res.* 58, 1238–1242.
- Diez, M., Hornick, J.L., Baldwin, P., Van Eenaeme, C., Istasse, L., 1998a. Etude des fibres alimentaires chez le chien: Présentation des résultats de 7 essais expérimentaux. *Ann. Med. Vet.* 142, 185–201.
- Diez, M., Hornick, J.L., Baldwin, P., Van Eenaeme, C., Istasse, L., 1998b. The influence of sugar-beet fibre, guar gum and inulin on nutrient digestibility, water consumption and plasma metabolites in healthy Beagle dogs. *Res. Vet. Sci.* 64, 91–96.
- Duncan, S.H., Belenguer, A., Holtrop, G., Johnstone, A.M., Flint, H.J., Lobley, G.E., 2007. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1073–1078.
- Duncan, S.H., Louis, P., Flint, H.J., 2004. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5810–5817.

- Dust, J.M., Grieshop, C.M., Parsons, C.M., Karr-Lilienthal, L.K., Schasteen, C.S., Quigley, J.D., Merchen, N.R., Fahey, G.C., 2005. Chemical composition, protein quality, palatability, and digestibility of alternative protein sources for dogs. *J. Anim. Sci.* 83, 2414–2422.
- Elitsur, Y., Strom, J., Luk, G.D., 1993. Inhibition of ornithine decarboxylase activity decreases polyamines and suppresses DNA synthesis in human colonic lamina propria lymphocytes. *Immunopharmacology* 25, 253–260.
- Elizondo, A.M., Mercado, E.C., Rabinovitz, B.C., Fernandez-Miyakawa, M.E., 2010. Effect of tannins on the in vitro growth of *Clostridium perfringens*. *Vet. Microbiol.* 145, 308–314.
- Elsden, S.R., Hilton, M.G., 1978. Volatile acid production from threonine, valine, leucine and isoleucine by clostridia. *Arch. Microbiol.* 117, 165–172.
- Englyst, H., 1987. Polysaccharide breakdown by mixed populations of human faecal bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 45, 163–171.
- Félix, A.P., Brito, C.M., Zanatta, C.P., Lima, D.C., Oliveira, S.G., Maiorka, A., 2013. Supplementation of fructooligosaccharides (FOS) on faecal characteristics of adult dogs. *Arch. Vet. Sci.* 18, 9–14.
- Ferrarelli, L.K., 2015. Why a High-Fiber Diet Prevents Cancer. *Sci. Signal.* 8, ec8–ec8.
- Flickinger, E.A., Schreijen, E.M.W.C., Patil, A.R., Hussein, H.S., Grieshop, C.M., Merchen, N.R., Fahey, G.C., 2003a. Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. *J. Anim. Sci.* 81, 2008–2018.
- Flickinger, E.A., Van Loo, J., Fahey, G.C., 2003b. Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43, 19–60.
- Flint, H.J., Scott, K.P., Duncan, S.H., Louis, P., Forano, E., 2012. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes* 3, 289–306.
- Foster, M.L., Dowd, S.E., Stephenson, C., Steiner, J.M., Suchodolski, J.S., 2013. Characterization of the Fungal Microbiome (Mycobiome) in Fecal Samples from Dogs 2013, 1–9.
- Franck, A., 2002. Technological functionality of inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* 87, S287 – S291.
- Fuentes-Zaragoza, E., Sánchez-Zapata, E., Sendra, E., Sayas, E., Navarro, C., Fernández-López, J., Pérez-Alvarez, J.A., 2011. Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch - Stärke* 63, 406–415.
- Funatogawa, K., Hayashi, S., Shimomura, H., Yoshida, T., Hatano, T., Ito, H., Hirai, Y., 2004. Antibacterial Activity of Hydrolyzable Tannins Derived from

- Medicinal Plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol. Immunol.* 48, 251–261.
- Fussell, R.J., McCalley, D. V., 1987. Determination of volatile fatty acids (C2-C5) and lactic acid in silage by gas chromatography. *Analyst* 112, 1213 – 1216.
- Garcia-Mazcorro, J.F., Lanerie, D.J., Dowd, S.E., Paddock, C.G., Grützner, N., Steiner, J.M., Ivanek, R., Suchodolski, J.S., 2011. Effect of a multi-species synbiotic formulation on fecal bacterial microbiota of healthy cats and dogs as evaluated by pyrosequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 78, 542–54.
- Garcia-Mazcorro, J.F., Suchodolski, J.S., Jones, K.R., Clark-Price, S.C., Dowd, S.E., Minamoto, Y., Markel, M., Steiner, J.M., Dossin, O., 2012. Effect of the proton pump inhibitor omeprazole on the gastrointestinal bacterial microbiota of healthy dogs. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80, 624–36.
- Gaudichon, C., Mahé, S., Benamouzig, R., Luengo, C., Fouillet, H., Daré, S., Van Oycke, M., Ferrière, F., Rautureau, J., Tomé, D., 1999. Net postprandial utilization of [¹⁵N]-labeled milk protein nitrogen is influenced by diet composition in humans. *J. Nutr.* 129, 890–895.
- Gausserès, N., Mahé, S., Benamouzig, R., Luengo, C., Drouet, H., Rautureau, J., Tomé, D., 1996. The gastro-ileal digestion of ¹⁵N-labelled pea nitrogen in adult humans. *Br. J. Nutr.* 76, 75–85.
- German, A.J., Day, M.J., Ruaux, C.G., Steiner, J.M., Williams, D.A., Hall, E.J., 2003. Comparison of Direct and Indirect Tests for Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Antibiotic-Responsive Diarrhea in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 33–43.
- Geypens, B., Claus, D., Evenepoel, P., Hiele, M., Maes, B., Peeters, M., Rutgeerts, P., Ghos, Y., 1997. Influence of dietary protein supplements on the formation of bacterial metabolites in the colon. *Gut* 41, 70–76.
- Gibson, G.R., Beatty, E.R., Wang, X., Cummings, J.H., 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 108, 975–982.
- Gibson, G.R., McCartney, A.L., Rastall, R.A., 2007. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. *Br. J. Nutr.* 93, S31–S34.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401–1412.
- Gibson, G.R., Willems, A., Reading, S., Collins, M.D., 1996. Fermentation of non-digestible oligosaccharides by human colonic bacteria. *Proc. Nutr. Soc.* 55, 899–912.
- Giffard, C.J., Collins, S.B., Stoodley, N.C., Butterwick, R.F., Batt, R.M., 2001. Administration of charcoal, *Yucca schidigera*, and zinc acetate to reduce malodorous flatulence in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218, 892–896.

- Gill, S.R., Pop, M., Deboy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., Nelson, K.E., 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312, 1355–1359.
- González-Ortiz, G., Castillejos, L., Mallo, J.J., Àngels Calvo-Torras, M., Dolores Baucells, M., 2013. Effects of dietary supplementation of *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 and *Enterococcus faecium* CECT 4515 in adult healthy dogs. *Arch. Anim. Nutr.* 67, 406–415.
- Greetham, H.L., Giffard, C., Hutson, R.A., Collins, M.D., Gibson, G.R., 2002. Bacteriology of the Labrador dog gut: a cultural and genotypic approach. *J. Appl. Microbiol.* 93, 640–646.
- Grieshop, C.M., Flickinger, E.A., Bruce, K.J., Patil, A.R., Czarnecki-Maulden, G.L., Fahey, G.C., 2004. Gastrointestinal and immunological responses of senior dogs to chicory and mannan-oligosaccharides. *Arch. Anim. Nutr.* 58, 483–493.
- Handl, S., Dowd, S.E., Garcia-Mazcorro, J.F., Steiner, J.M., Suchodolski, J.S., 2011. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76, 301–310.
- Hanfrey, C.C., Pearson, B.M., Hazeldine, S., Lee, J., Gaskin, D.J., Woster, P.M., Phillips, M.A., Michael, A.J., 2011. Alternative spermidine biosynthetic route is critical for growth of *Campylobacter jejuni* and is the dominant polyamine pathway in human gut microbiota. *J. Biol. Chem.* 286, 43301–43312.
- Hang, I., Heilmann, R.M., Grützner, N., Suchodolski, J.S., Steiner, J.M., Atroshi, F., Sankari, S., Kettunen, A., de Vos, W.M., Zentek, J., Spillmann, T., 2013. Impact of diets with a high content of greaves-meal protein or carbohydrates on faecal characteristics, volatile fatty acids and faecal calprotectin concentrations in healthy dogs. *BMC Vet. Res.* 9, 201.
- Hang, I., Rinttila, T., Zentek, J., Kettunen, A., Alaja, S., Apajalahti, J., Harmoinen, J., de Vos, W.M., Spillmann, T., 2012. Effect of high contents of dietary animal-derived protein or carbohydrates on canine faecal microbiota. *BMC Vet. Res.* 8, 90.
- Harmsen, H.J.M., Gibson, G.R., Elfferich, P., Raangs, G.C., Wildeboer-Veloo, A.C.M., Argaziz, A., Roberfroid, M.B., Welling, G.W., 2000. Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 125–129.
- He, T., Priebe, M.G., Vonk, R.J., Welling, G.W., 2005. Identification of bacteria with beta-galactosidase activity in faeces from lactase non-persistent subjects. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 463–469.

- He, T., Venema, K., Priebe, M.G., Welling, G.W., Brummer, R.-J.M., Vonk, R.J., 2008. The role of colonic metabolism in lactose intolerance. *Eur. J. Clin. Invest.* 38, 541–547.
- Heby, O., 1981. Role of Polyamines in the Control of Cell Proliferation and Differentiation. *Differentiation* 19, 1–20.
- Herschel, D.A., Argenzio, R.A., Southworth, M., Stevens, C.E., 1981. Absorption of volatile fatty acid, Na, and H₂O by the colon of the dog. *Am. J. Vet. Res.* 42, 1118–1124.
- Hesta, M., Hoornaert, E., Verlinden, A., Janssens, G.P.J., 2005. The effect of oligofructose on urea metabolism and faecal odour components in cats. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 89, 208–214.
- Hesta, M., Janssens, G.P.J., Debraekeleer, J., De Wilde, R., 2001. The effect of oligofructose and inulin on faecal characteristics and nutrient digestibility in healthy cats. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 85, 135–141.
- Hesta, M., Janssens, G.P.J., Millet, S., De Wilde, R., 2003. Prebiotics affect nutrient digestibility but not faecal ammonia in dogs fed increased dietary protein levels. *Br. J. Nutr.* 90, 1007–1014.
- Hill, B.C., Woon, T.C., Nicholls, P., Peterson, J., Greenwood, C., Thomson, A.J., 1984. Interactions of sulphide and other ligands with cytochrome c oxidase. An electron-paramagnetic-resonance study. *Biochem. J.* 224, 591–600.
- Hill, R.C., Choate, C.J., Scott, K.C., Molenberghs, G., 2009. Comparison of the guaranteed analysis with the measured nutrient composition of commercial pet foods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 234, 347–351.
- Hipsley, E.H., 1953. Dietary “fibre” and pregnancy toxemia. *Br. Med. J.* 2, 420–422.
- Hooda, S., Minamoto, Y., Suchodolski, J.S., Swanson, K.S., 2012. Current state of knowledge: the canine gastrointestinal microbiome. *Anim. Health Res. Rev.* 13, 78–88.
- Hooda, S., Vester Boler, B.M., Kerr, K.R., Dowd, S.E., Swanson, K.S., 2013. The gut microbiome of kittens is affected by dietary protein:carbohydrate ratio and associated with blood metabolite and hormone concentrations. *Br. J. Nutr.* 109, 1637–1646.
- Howard, M.D., Kerley, M.S., Sunvold, G.D., Reinhart, G.A., 2000. Source of dietary fiber fed to dogs affects nitrogen and energy metabolism and intestinal microflora populations. *Nutr. Res.* 20, 1473–1484.
- Hughes, R., Magee, E.A., Bingham, S., 2000. Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 1, 51–58.

- Hussain, I., Ismail, A.M., Cheeke, P.R., 1996. Effects of feeding *Yucca schidigera* extract in diets varying in crude protein and urea contents on growth performance and cecum and blood urea and ammonia concentrations of rabbits. *Anim. Feed Sci. Technol.* 62, 121–129.
- Hussein, H.S., Flickinger, E.A., Fahey, G.C., 1999. Petfood applications of inulin and oligofructose, in: *Journal of Nutrition*.
- Hussein, H.S., Sunvold, G.D., 2000. Dietary strategies to decrease dog and cat fecal odor components. *Recent Adv. Canine Feline Nutr. Vol. 3, Iams Nutr. Symp. Proc.* 153–168.
- Imaizumi, K., Nakatsu, Y., Sato, M., Sedarnawati, Y., Sugano, M., 1991. Effects of xylooligosaccharides on blood glucose, serum and liver lipids and cecum short-chain fatty acids in diabetic rats. *Agric. Biol. Chem.* 55, 199–205.
- Inness, V.L., McCartney, A.L., Khoo, C., Gross, K.L., Gibson, G.R., 2007. Molecular characterisation of the gut microflora of healthy and inflammatory bowel disease cats using fluorescence in situ hybridisation with special reference to *Desulfovibrio* spp. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 91, 48–53.
- Ito, M., Kimura, M., 1993. Influence of Lactose on Faecal Microflora in Lactose Maldigestors. *Microb. Ecol. Health Dis.* 6, 73–76.
- Johnson, M., Parsons, C., 1997. Effects of raw material source, ash content, and assay length on protein efficiency ratio and net protein ratio values for animal protein meals. *Poult. Sci.* 76, 1722–1727.
- Johnston, K., Lamport, A., Batt, R., 1993. An unexpected bacterial flora in the proximal small intestine of normal cats. *Vet. Rec.* 132, 362–363.
- Juri, M.G.F., Muzzolon, J., Dalcero, A.M., Magnoli, C.E., 2013. Inhibitory properties of *Enterococcus* spp. isolated from faeces of healthy dogs. *J. Environ. Sci. Heal.* 48, 983–992.
- Kanakupt, K., Vester Boler, B.M., Dunsford, B.R., Fahey, G.C., 2011. Effects of short-chain fructooligosaccharides and galactooligosaccharides, individually and in combination, on nutrient digestibility, fecal fermentative metabolite concentrations, and large bowel microbial ecology of healthy adults cats. *J. Anim. Sci.* 89, 1376–1384.
- Karr-Lilienthal, L.K., Grieshop, C.M., Spears, J.K., Patil, A.R., Czarnecki-Maulden, G.L., Merchen, N.R., Fahey, G.C., 2004. Estimation of the proportion of bacterial nitrogen in canine feces using diaminopimelic acid as an internal bacterial marker. *J. Anim. Sci.* 82, 1707–1712.
- Kau, A.L., Ahern, P.P., Griffin, N.W., Goodman, A.L., Gordon, J.I., 2011. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* 474, 327–336.
- Kaur, N., Gupta, A.K., 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J. Biosci.* 27, 703–714.

- Kellow, N.J., Coughlan, M.T., Reid, C.M., 2014. Metabolic benefits of dietary prebiotics in human subjects: a systematic review of randomised controlled trials. *Br. J. Nutr.* 111, 1147–61.
- Kerr, K.R., Beloshapka, A.N., Morris, C.L., Parsons, C.M., Burke, S.L., Utterback, P.L., Swanson, K.S., 2013. Evaluation of four raw meat diets using domestic cats, captive exotic felids, and cecectomized roosters. *J. Anim. Sci.* 91, 225–237.
- Kerr, K.R., Vester Boler, B.M., Morris, C.L., Liu, K.J., Swanson, K.S., 2012. Apparent total tract energy and macronutrient digestibility and fecal fermentative end-product concentrations of domestic cats fed extruded, raw beef-based, and cooked beef-based diets. *J. Anim. Sci.* 90, 515–522.
- Killeen, G.F., Connolly, C.R., Walsh, G.A., Duffy, C.F., Headon, D.R., Power, R.F., 1998a. The effects of dietary supplementation with *Yucca schidigera* extract or fractions thereof on nitrogen metabolism and gastrointestinal fermentation processes in the rat. *J. Sci. Food Agric.* 76, 91–99.
- Killeen, G.F., Madigan, C.A., Connolly, C.R., Walsh, G.A., Clark, C., Hynes, M.J., Timmins, B.F., James, P., Headon, D.R., Power, R.F., 1998b. Antimicrobial Saponins of *Yucca schidigera* and the Implications of Their in Vitro Properties for Their in Vivo Impact. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3178–3186.
- Knarreborg, A., Miquel, N., Granli, T., Jensen, B., 2002. Establishment and application of an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 99, 131–140.
- Koenig, J.E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A.D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L.T., Ley, R.E., 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 Suppl, 4578–4585.
- Kuzmuk, K.N., Swanson, K.S., Tappenden, K.A., Schook, L.B., Fahey, G.C., 2005. Diet and age affect intestinal morphology and large bowel fermentative end-product concentrations in senior and young adult dogs. *J. Nutr.* 135, 1940–1945.
- Laparra, J.M., Sanz, Y., 2010. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacol. Res.* 61, 219–225.
- Le, P.D., Aarnink, A.J.A., Ogink, N.W.M., Becker, P.M., Verstegen, M.W.A., 2005. Odour from animal production facilities: its relationship to diet. *Nutr. Res. Rev.* 18, 3–30.
- Leib, M.S., 2000. Treatment of Chronic Idiopathic Large-Bowel Diarrhea in Dogs with a Highly Digestible Diet and Soluble Fiber: A Retrospective Review of 37 Cases. *J. Vet. Intern. Med.* 14, 27–32.

- Leschelle, X., Gubern, M., Andriamihaja, M., Blottière, H.M., Couplan, E., Gonzalez-Barroso, M.-D.-M., Petit, C., Pagniez, A., Chaumontet, C., Mignotte, B., Bouillaud, F., Blachier, F., 2005. Adaptative metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide. *Biochim. Biophys. Acta* 1725, 201–212.
- Levine, J., Ellis, C.J., Furne, J.K., Springfield, J., Levitt, M.D., 1998. Fecal Hydrogen Sulfide Production in Ulcerative Colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 93, 83–87.
- Liener, I.E., 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34, 31–67.
- Liévin-Le Moal, V., Servin, A.L., 2006. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 315–337.
- Lin, H.C., Visek, W.J., 1991. Colon mucosal cell damage by ammonia in rats. *J. Nutr.* 121, 887–893.
- Lomer, M.C.E., 2015. Review article: the aetiology, diagnosis, mechanisms and clinical evidence for food intolerance. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 41, 262–275.
- Louis, P., Hold, G., Flint, H., 2014. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 661–672.
- Lowe, J., Kershaw, S., 1997. The ameliorating effect of *Yucca schidigera* extract on canine and feline faecal aroma. *Res. Vet. Sci.* 63, 61–66.
- Lowe, J., Kershaw, S., Taylor, A., Linforth, R.S., 1997. The effect of *Yucca schidigera* extract on canine and feline faecal volatiles occurring concurrently with faecal aroma amelioration. *Res. Vet. Sci.* 63, 67–71.
- Lubbs, D.C., Vester, B.M., Fastinger, N.D., Swanson, K.S., 2009. Dietary protein concentration affects intestinal microbiota of adult cats: a study using DGGE and qPCR to evaluate differences in microbial populations in the feline gastrointestinal tract. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 93, 113–121.
- Macfarlane, G., Gibson, G.R., Beatty, E.R., Cummings, J.H., 1992. Estimation of short-chain fatty acid production from protein by human intestinal bacteria based on branched-chain fatty acid measurements. *FEMS Microbiol. Lett.* 101, 81–88.
- Macfarlane, G.T., Allison, C., Gibson, S.A.W., Cummings, J.H., 1988. Contribution of the microflora to proteolysis in the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 64, 37–46.
- Macfarlane, G.T., Cummings, J.H., 1991. The colonic flora, fermentation, and large bowel digestive function, *The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease*. Raven Press, New York.

- Macfarlane, G.T., Cummings, J.H., Allison, C., 1986. Protein Degradation by Human Intestinal Bacteria. *Microbiology* 132, 1647–1656.
- Macfarlane, G.T., Gibson, G.R., 1995. Microbiological aspects of the production of short-chain fatty acids in the large bowel, *Physiological and Clinical Aspects of Short-Chain Fatty Acids*. Cambridge University Press: Cambridge.
- Machiels, K., Joossens, M., Sabino, J., De Preter, V., Arijs, I., Eeckhaut, V., Ballet, V., Claes, K., Van Immerseel, F., Verbeke, K., Ferrante, M., Verhaegen, J., Rutgeerts, P., Vermeire, S., 2014. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 63, 1275–1283.
- Mäkivuokko, H.A., Saarinen, M.T., Ouwehand, A.C., Rautonen, N.E., 2006. Effects of lactose on colon microbial community structure and function in a four-stage semi-continuous culture system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 2056–2063.
- Malinen, E., 2003. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology* 149, 269–277.
- Marchesi, J.R., 2010. Prokaryotic and eukaryotic diversity of the human gut. *Adv. Appl. Microbiol.* 72, 43–62.
- Mariotti, F., Pueyo, M.E., Tomé, D., Bérot, S., Benamouzig, R., Mahé, S., 2001. The influence of the albumin fraction on the bioavailability and postprandial utilization of pea protein given selectively to humans. *J. Nutr.* 131, 1706–1713.
- Martínez, I., Kim, J., Duffy, P.R., Schlegel, V.L., Walter, J., 2010. Resistant starches types 2 and 4 have differential effects on the composition of the fecal microbiota in human subjects. *PLoS One* 5, e15046.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Miyamoto, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Oyaizu, H., Tanaka, R., 2002. Development of 16S rRNA-Gene-Targeted Group-Specific Primers for the Detection and Identification of Predominant Bacteria in Human Feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5445–5451.
- Matsumoto, M., Benno, Y., 2007. The Relationship between Microbiota and Polyamine Concentration in the Human Intestine: A Pilot Study. *Microbiol. Immunol.* 51, 25–35.
- Mattar, R., de Campos Mazo, D.F., Carrilho, F.J., 2012. Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 5, 113–121.
- McQuaid, T.S., 2005. Medical management of a patent ductus venosus in a dog. *Can. Vet. J.* 46, 352–356.
- McSweeney, C.S., Mackie, R.I., White, B.A., 1994. Transport and intracellular metabolism of major feed compounds by ruminal bacteria: The potential for metabolic manipulation. *Aust. J. Agric. Res.* 45, 731–756.

- Meijers, B.K.I., De Preter, V., Verbeke, K., Vanrenterghem, Y., Evenepoel, P., 2009. p-Cresyl sulfate serum concentrations in haemodialysis patients are reduced by the prebiotic oligofructose-enriched inulin. *Nephrol. Dial. Transplant* 25, 219–224.
- Mentula, S., Harmoinen, J., Heikkilä, M., Westermarck, E., Rautio, M., Huovinen, P., Könönen, E., 2005. Comparison between cultured small-intestinal and fecal microbiotas in beagle dogs. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4169–75.
- Meyer, H., Zentek, J., 1998. Ernährung des Hundes: Grundlagen-Fütterung-Diätetik. Parey Buchverlag Berlin.
- Middelbos, I.S., Fastinger, N.D., Fahey, G.C., 2007. Evaluation of fermentable oligosaccharides in diets fed to dogs in comparison to fiber standards. *J. Anim. Sci.* 85, 3033–3044.
- Middelbos, I.S., Vester Boler, B.M., Qu, A., White, B.A., Swanson, K.S., Fahey, G.C., 2010. Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing. *PLoS One* 5, e9768.
- Montagne, L., Pluske, J., Hampson, D., 2003. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Anim. Feed Sci. Technol.* 108, 95–117.
- Morris, D.R., 1991. A new perspective on ornithine decarboxylase regulation: prevention of polyamine toxicity is the overriding theme. *J. Cell. Biochem.* 46, 102–105.
- Mortensen, P.B., Clausen, M.R., 1996. Short-chain fatty acids in the human colon: Relation to gastrointestinal health and disease. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 31, 132–148.
- Mortensen, P.B., Holtug, K., Bonnén, H., Clausen, M.R., 1990. The degradation of amino acids, proteins, and blood to short-chain fatty acids in colon is prevented by lactulose. *Gastroenterology* 98, 353–360.
- Mosenthin, R., Sauer, W., Henkel, H., Harens, F., de Lange, C.F.M., 1992. Tracer studies of urea kinetics in growing pigs: II. The effect of starch infusion at the distal ileum on urea recycling and bacterial nitrogen excretion. *J. Anim. Sci.* 70, 3467–3472.
- Mouillé, B., Morel, E., Robert, V., Guihot-Joubrel, G., Blachier, F., 1999. Metabolic capacity for l-citrulline synthesis from ammonia in rat isolated colonocytes. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1427, 401–407.
- Mouillé, B., Robert, V., Blachier, F., 2004. Adaptative increase of ornithine production and decrease of ammonia metabolism in rat colonocytes after hyperproteic diet ingestion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287, G344–351.

- Muir, J.G., Yeow, E.G.W., Keogh, J., Pizzey, C., Bird, A.R., Sharpe, K., O'Dea, K., Macrae, F.A., 1998. Combining wheat bran with resistant starch has more beneficial effects on fecal indexes than does wheat bran alone. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 372–379.
- Murray, S.M., Patil, A.R., Fahey, G.C., Merchen, N.R., Hughes, D.M., 1997. Raw and Rendered Animal By-Products as Ingredients in Dog Diets. *J. Anim. Sci.* 75, 2497–2505.
- Musch, M.W., Bookstein, C., Xie, Y., Sellin, J.H., Chang, E.B., 2001. SCFA increase intestinal Na absorption by induction of NHE3 in rat colon and human intestinal C2/bbe cells. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 280, G687–G693.
- Nazeer, M.S., Pasha, T.N., Abbas, S., Ali, Z., 2002. Effect of yucca saponin on urease activity and development of ascites in broiler chickens. *Int. J. Poult. Sci.* 1, 174–178.
- Nery, J., Biourge, V., Tournier, C., Leray, V., Martin, L., Dumon, H., Nguyen, P., 2010. Influence of dietary protein content and source on fecal quality, electrolyte concentrations, and osmolarity, and digestibility in dogs differing in body size. *J. Anim. Sci.* 88, 159–169.
- Nery, J., Goudez, R., Biourge, V., Tournier, C., Leray, V., Martin, L., Thorin, C., Nguyen, P., Dumon, H., 2012. Influence of dietary protein content and source on colonic fermentative activity in dogs differing in body size and digestive tolerance. *J. Anim. Sci.* 90, 2570–2580.
- Nordgaard, I., Mortensen, P.B., Langkilde, A.M., 1995. Small intestinal malabsorption and colonic fermentation of resistant starch and resistant peptides to short-chain fatty acids. *Nutrition* 11, 129–137.
- Nousiainen, J., 1991. Comparative observations on selected probiotics and olaquinox as feed additives for piglets around weaning. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 66, 224–230.
- Nowak, A., Libudzisz, Z., 2006. Influence of phenol, p-cresol and indole on growth and survival of intestinal lactic acid bacteria. *Anaerobe* 12, 80–84.
- Nyangale, E.P., Mottram, D.S., Gibson, G.R., 2012. Gut microbial activity, implications for health and disease: the potential role of metabolite analysis. *J. Proteome Res.* 11, 5573–5585.
- Painter, N.S., Burkitt, D.P., 1971. Diverticular disease of the colon: a deficiency disease of Western civilization. *BMJ* 2, 450–454.
- Pegg, A.E., 2013. Toxicity of polyamines and their metabolic products. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 1782–1800.
- Pierce, K.M., Callan, J.J., McCarthy, P., O'Doherty, J.V., 2007. The interaction between lactose level and crude protein concentration on piglet post-weaning

- performance, nitrogen metabolism, selected faecal microbial populations and faecal volatile fatty acid concentrations. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132, 267–282.
- Pierce, K.M., Sweeney, T., Callan, J.J., Byrne, C., McCarthy, P., O’Doherty, J.V., 2006a. The effect of inclusion of a high lactose supplement in finishing diets on nutrient digestibility, nitrogen excretion, volatile fatty acid concentrations and ammonia emission from boars. *Anim. Feed Sci. Technol.* 125, 45–60.
- Pierce, K.M., Sweeney, T., Callan, J.J., Byrne, C., McCarthy, P., O’Doherty, J.V., 2006b. The effect of lactose and inulin on intestinal morphology, selected microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the gastro-intestinal tract of the weanling pig. *Anim. Sci.* 82, 311–318.
- Pieroni, K.P., Bass, D., 2011. Proton pump inhibitor treatment for congenital chloride diarrhea. *Dig. Dis. Sci.* 56, 673–676.
- Pinna, C., Biagi, G., 2014. The utilisation of prebiotics and synbiotics in dogs. *Ital. J. Anim. Sci.* 13, 169–178.
- Pinna, C., Stefanelli, C., Biagi, G., 2014. In vitro effect of dietary protein level and nondigestible oligosaccharides on feline fecal microbiota. *J. Anim. Sci.* 92, 5593–5602.
- Pitcher, M., Cummings, J., 1996. Hydrogen sulphide: a bacterial toxin in ulcerative colitis? *Gut* 39, 1–4.
- Preston, R.L., Bartle, S.J., May, T., Goodall, S.R., 1987. Influence of Sarsaponin on Growth, Feed and Nitrogen Utilization in Growing Male Rats Fed Diets with Added Urea or Protein. *J. Anim. Sci.* 65, 481–487.
- Preston, R., Bartle, S., Goodall, S., 1985. Influence of sarsaponin on growth, feed and nitrogen utilisation in growing male rats fed diets with and without urea. *J. Anim. Sci.* 61, 301–305.
- Propst, E.L., Flickinger, E.A., Bauer, L.L., Merchen, N.R., Fahey, G.C., 2003. A dose-response experiment evaluating the effects of oligofructose and inulin on nutrient digestibility, stool quality, and fecal protein catabolites in healthy adult dogs. *J. Anim. Sci.* 81, 3057–3066.
- Ramsay, A.G., Scott, K.P., Martin, J.C., Rincon, M.T., Flint, H.J., 2006. Cell-associated alpha-amylases of butyrate-producing Firmicute bacteria from the human colon. *Microbiology* 152, 3281–3290.
- Rasmussen, H.S., Holtug, K., Mortensen, P.B., 1988. Degradation of Amino Acids to Short-Chain Fatty Acids in Humans: An in Vitro Study. *Scand. J. Gastroenterol.* 23, 178–182.
- Reiffenstein, R.J., Hulbert, W.C., Roth, S.H., 1992. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32, 109–134.

- Relman, D.A., 2012. Microbiology: Learning about who we are. *Nature* 486, 194–5.
- Respondek, F., Swanson, K.S., Belsito, K.R., Vester, B.M., Wagner, A., Istasse, L., Diez, M., 2008. Short-Chain Fructooligosaccharides Influence Insulin Sensitivity and Gene Expression of Fat Tissue in Obese Dogs. *J. Nutr.* 138, 1712–1718.
- Rideout, T.C., Fan, M.Z., Cant, J.P., Wagner-Riddle, C., Stonehouse, P., 2004. Excretion of major odor-causing and acidifying compounds in response to dietary supplementation of chicory inulin in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 82, 1678–1684.
- Rinttilä, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogius, L., Palva, A., 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* 97, 1166–1177.
- Ritchie, L.E., Burke, K.F., Garcia-Mazcorro, J.F., Steiner, J.M., Suchodolski, J.S., 2010. Characterization of fecal microbiota in cats using universal 16S rRNA gene and group-specific primers for *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. *Vet. Microbiol.* 144, 140–146.
- Ritchie, L.E., Steiner, J.M., Suchodolski, J.S., 2008. Assessment of microbial diversity along the feline intestinal tract using 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66, 590–598.
- Rivellese, A., Giacco, A., Genovese, S., Riccardi, G., Pacioni, D., Mattioli, P.L., Mancini, M., 1980. Effect of dietary fibre on glucose control and serum lipoproteins in diabetic patients. *Lancet* 316, 447–450.
- Roberfroid, M., 2007. Prebiotics: The Concept Revisited. *J. Nutr.* 137, 830S–837.
- Rochus, K., Janssens, G.P.J., Hesta, M., 2014. Dietary fibre and the importance of the gut microbiota in feline nutrition: a review. *Nutr. Res. Rev.* 27, 295–307.
- Rodríguez, R., Jiménez, A., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R., Heredia, A., 2006. Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 3–15.
- Roediger, W.E., Duncan, A., Kapaniris, O., Millard, S., 1993. Reducing sulfur compounds of the colon impair colonocyte nutrition: implications for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 104, 802–809.
- Roediger, W.E.W., 1980. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut* 21, 793–798.
- Roediger, W.E.W., Moore, A., 1981. Effect of short-chain fatty acid on sodium absorption in isolated human colon perfused through the vascular bed. *Dig. Dis. Sci.* 26, 100–106.

- Round, J.L., Mazmanian, S.K., 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 313–323.
- Royall, D., Wolever, T.M., Jeejeebhoy, K.N., 1990. Clinical significance of colonic fermentation. *Am. J. Gastroenterol.* 85, 1307–1312.
- Russell, J.B., Sniffen, C.J., Van Soest, P.J., 1983. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 66, 763–775.
- Russell, W.R., Gratz, S.W., Duncan, S.H., Holtrop, G., Ince, J., Scobbie, L., Duncan, G., Johnstone, A.M., Lobley, G.E., Wallace, R.J., Duthie, G.G., Flint, H.J., 2011. High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *Am. J. Clin. Nutr.* 93, 1062–72.
- Salonen, A., de Vos, W.M., 2014. Impact of diet on human intestinal microbiota and health. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 5, 239–262.
- Salonen, A., Nikkilä, J., Jalanka-Tuovinen, J., Immonen, O., Rajilić-Stojanović, M., Kekkonen, R. a, Palva, A., de Vos, W.M., 2010. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *J. Microbiol. Methods* 81, 127–134.
- Schaible, U.E., Kaufmann, S.H.E., 2005. A nutritive view on the host-pathogen interplay. *Trends Microbiol.* 13, 373–380.
- Scholz-Ahrens, K.E., Ade, P., Marten, B., Weber, P., Timm, W., Açil, Y., Glüer, C.C., Schrezenmeir, J., 2007. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *J. Nutr.* 137, 838S–846.
- Scott, K.P., Duncan, S.H., Flint, H.J., 2008. Dietary fibre and the gut microbiota. *Nutr. Bull.* 33, 201–211.
- Scott, K.P., Gratz, S.W., Sheridan, P.O., Flint, H.J., Duncan, S.H., 2013. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol. Res.* 69, 52–60.
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., Finlay, B.B., 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* 90, 859–904.
- Simpson, J.M., Martineau, B., Jones, W.E., Ballam, J.M., Mackie, R.I., 2002. Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. *Microb. Ecol.* 44, 186–97.
- Smith, B., Li, N., Andersen, A.S., Slotved, H.C., Kroghelt, K.A., 2011. Optimising bacterial DNA extraction from faecal samples: comparison of three methods. *Open Microbiol. J.* 5, 14–7.

- Smith, E.A., Macfarlane, G.T., 1996. Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: Effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 288–302.
- Smith, E.A., Macfarlane, G.T., 1996. Studies on Amine Production in the Human Colon: Enumeration of Amine forming Bacteria and Physiological Effects of Carbohydrate and pH. *Anaerobe* 2, 285–297.
- Smith, E.A., Macfarlane, G.T., 1997a. Dissimilatory amino Acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe* 3, 327–337.
- Smith, E.A., Macfarlane, G.T., 1997b. Formation of Phenolic and Indolic Compounds by Anaerobic Bacteria in the Human Large Intestine. *Microb. Ecol.* 33, 180–188.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H.M., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P., Langella, P., 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16731–16736.
- Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., Coton, E., Coton, M., Barnavon, L., Bach, B., Rattray, F., Bunte, A., Magni, C., Ladero, V., Alvarez, M., Fernández, M., Lopez, P., de Palencia, P.F., Corbi, A., Trip, H., Lolkema, J.S., 2010. Biogenic amines in fermented foods. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64 Suppl 3, S95–100.
- Sparkes, A.H., Papasouliotis, K., Sunvold, G., Werrett, G., Clarke, C., Jones, M., Gruffydd-Jones, T.J., Reinhart, G., 1998a. Bacterial flora in the duodenum of healthy cats, and effect of dietary supplementation with fructo-oligosaccharides. *Am. J. Vet. Res.* 59, 431–435.
- Sparkes, A.H., Papasouliotis, K., Sunvold, G., Werrett, G., Gruffydd-Jones, E.A., Egan, K., Gruffydd-Jones, T.J., Reinhart, G., 1998b. Effect of dietary supplementation with fructo-oligosaccharides on fecal flora of healthy cats. *Am. J. Vet. Res.* 59, 436–440.
- Spiegel, J.E., Rose, R., Karabell, P., Frankos, V.H., Schmitt, D.F., 1994. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. *Food Technol.* 48, 85–89.
- Spring, P., Wenk, C., Dawson, K.A., Newman, K.E., 2000. The Effects of Dietary Mannan oligosaccharides on Cecal Parameters and the Concentrations of Enteric Bacteria in the Ceca of Salmonella-Challenged Broiler Chicks. *Poult. Sci.* 79, 205–211.

- Stefanelli, C., Carati, D., Rossoni, C., 1986. Separation of N1- and N8-acetylspermidine isomers by reversed-phase column liquid chromatography after derivatization with dansyl chloride. *J. Chromatogr.* 375, 49–55.
- Stevens, C.E., Hume, I.D., 1998. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiol. Rev.* 78, 393–427.
- Strickling, J., Harmon, D., Dawson, K., Gross, K., 2000. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. *Anim. Feed Sci. Technol.* 86, 205–219.
- Strompfová, V., Lauková, A., Cilik, D., 2013. Synbiotic administration of canine-derived strain *Lactobacillus fermentum* CCM 7421 and inulin to healthy dogs. *Can. J. Microbiol.* 59, 347–352.
- Suchodolski, J.S., 2011. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 41, 261–272.
- Suchodolski, J.S., Camacho, J., Steiner, J.M., 2008a. Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66, 567–78.
- Suchodolski, J.S., Dowd, S.E., Westermarck, E., Steiner, J.M., Wolcott, R.D., Spillmann, T., Harmoinen, J.A., 2009. The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. *BMC Microbiol.* 9, 210.
- Suchodolski, J.S., Morris, E.K., Allenspach, K., Jergens, A.E., Harmoinen, J.A., Westermarck, E., Steiner, J.M., 2008b. Prevalence and identification of fungal DNA in the small intestine of healthy dogs and dogs with chronic enteropathies. *Vet. Microbiol.* 132, 379–388.
- Suchodolski, J.S., Ruaux, C.G., Steiner, J.M., Fetz, K., Williams, D.A., 2005. Assessment of the qualitative variation in bacterial microflora among compartments of the intestinal tract of dogs by use of a molecular fingerprinting technique. *Am. J. Vet. Res.* 66, 1556–1562.
- Summerskill, W.H., Wolpert, E., 1970. Ammonia metabolism in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 23, 633–639.
- Sunvold, G.D., Fahey, G.C., Merchen, N.R., Bourquin, L.D., Titgemeyer, E.C., Bauer, L.L., Reinhart, G.A., 1995a. Dietary fiber for cats: in vitro fermentation of selected fiber sources by cat fecal inoculum and in vivo utilization of diets containing selected fiber sources and their blends. *J. Anim. Sci.* 73, 2329–2339.
- Sunvold, G.D., Fahey, G.C., Merchen, N.R., Reinhart, G.A., 1995b. In vitro fermentation of selected fibrous substrates by dog and cat fecal inoculum: influence of diet composition on substrate organic matter disappearance and short-chain fatty acid production. *J. Anim. Sci.* 73, 1110–1122.

- Sunvold, G.D., Hussein, H.S., Fahey, G.C., Merchen, N.R., Reinhart, G.A., 1995c. In vitro fermentation of cellulose, beet pulp, citrus pulp, and citrus pectin using fecal inoculum from cats, dogs, horses, humans, and pigs and ruminal fluid from cattle. *J. Anim. Sci.* 73, 3639–3648.
- Swanson, K.S., Dowd, S.E., Suchodolski, J.S., Middelbos, I.S., Vester, B.M., Barry, K.A., Nelson, K.E., Torralba, M., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Cann, I.K.O., White, B.A., Fahey, G.C., 2011. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME J.* 5, 639–649.
- Swanson, K.S., Grieshop, C.M., Flickinger, E.A., Bauer, L.L., Chow, J., Wolf, B.W., Garleb, K.A., Fahey, G.C., 2002a. Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* modify gut microbial populations, total tract nutrient digestibilities and fecal protein catabolite concentrations in healthy adult dogs. *J. Nutr.* 132, 3721–3731.
- Swanson, K.S., Grieshop, C.M., Flickinger, E.A., Bauer, L.L., Healy, H.P., Dawson, K.A., Merchen, N.R., Fahey, G.C., 2002b. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. *J. Nutr.* 132, 980–989.
- Swanson, K.S., Grieshop, C.M., Flickinger, E.A., Merchen, N.R., Fahey, G.C., 2002c. Effects of supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides on colonic microbial populations, immune function and fecal odor components in the canine. *J. Nutr.* 132, 1717S–1719S.
- Szilagy, A., Shrier, I., Heilpern, D., Je, J., Park, S., Chong, G., Lalonde, C., Cote, L.-F., Lee, B., 2010. Differential impact of lactose/lactase phenotype on colonic microflora. *Can. J. Gastroenterol.* 24, 373–379.
- Tangerman, A., 2009. Measurement and biological significance of the volatile sulfur compounds hydrogen sulfide, methanethiol and dimethyl sulfide in various biological matrices. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877, 3366–3377.
- Toden, S., Bird, A.R., Topping, D.L., Conlon, M.A., 2005. Resistant starch attenuates colonic DNA damage induced by higher dietary protein in rats. *Nutr. Cancer* 51, 45–51.
- Toden, S., Bird, A.R., Topping, D.L., Conlon, M.A., 2006. Resistant starch prevents colonic DNA damage induced by high dietary cooked red meat or casein in rats. *Cancer Biol. Ther.* 5, 267–272.
- Tomomatsu, H., 1994. Health effects of oligosaccharides. *Food Technol.* 48, 61–65.
- Topping, D.L., Clifton, P.M., 2001. Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides. *Physiol Rev* 81, 1031–1064.

- Torres, D.P.M., Gonçalves, M. do P.F., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R., 2010. Galacto-Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9, 438–454.
- Tortola, L., Brunetto, M.A., Zaine, L., Vasconcellos, R.S., Oliveira, M.C. de C., Nogueira, S.P., Carciofi, A.C., 2009. Uso de psyllium para controle de constipação em cães. *Ciência Rural* 39, 2638–2641.
- Totton, S.C., Farrar, A.M., Wilkins, W., Bucher, O., Waddell, L.A., Wilhelm, B.J., McEwen, S.A., Rajić, A., 2012. The effectiveness of selected feed and water additives for reducing *Salmonella* spp. of public health importance in broiler chickens: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression approach. *Prev. Vet. Med.* 106, 197–213.
- Tran, H., Moreno, R., Hinkle, E.E., Bundy, J.W., Walter, J., Burkey, T.E., Miller, P.S., 2012. Effects of lactose and yeast-dried milk on growth performance, fecal microbiota, and immune parameters of nursery pigs. *J. Anim. Sci.* 90, 3049–3059.
- Trowell, H., 1972. Ischemic heart disease and dietary fiber. *Am J Clin Nutr* 25, 926–932.
- Trowell, H., Southgate, D., Wolever, T., 1976. Dietary fibre redefined. *Lancet* 1, 7966–7967.
- Twomey, L.N., Pluske, J.R., Rowe, J.B., Choct, M., Brown, W., Pethick, D.W., 2003. The effects of added fructooligosaccharide (Raftilose®P95) and inulinase on faecal quality and digestibility in dogs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 108, 83–93.
- Uribe-Esquivel, M., Moran, S., Poo, J.L., Muñoz, R.M., 1997. In vitro and in vivo lactose and lactulose effects on colonic fermentation and portal-systemic encephalopathy parameters. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 222, 49–52.
- Ushida, K., Hoshi, S., Ajisaka, K., 2002. ¹³C-NMR studies on lactate metabolism in a porcine gut microbial ecosystem. *Microb. Ecol. Health Dis.* 14, 241–246.
- Vahjen, W., Männer, K., 2003. The effect of a probiotic enterococcus faecium product in diets of healthy dogs on bacteriological counts of salmonella spp., campylobacter spp. and clostridium spp. in faeces. *Arch. Anim. Nutr.* 57, 229–233.
- Van der Meulen, J., Bakker, G.C., Bakker, J.G., de Visser, H., Jongbloed, A.W., Everts, H., 1997. Effect of resistant starch on net portal-drained viscera flux of glucose, volatile fatty acids, urea, and ammonia in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 75, 2697–2704.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–97.

- Vanhoutte, T., Huys, G., De Brandt, E., Fahey, G.C., Swings, J., 2005. Molecular monitoring and characterization of the faecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. *FEMS Microbiol. Lett.* 249, 65–71.
- Verdonk, J.M.A.J., Shim, S.B., van Leeuwen, P., Verstegen, M.W.A., 2007. Application of inulin-type fructans in animal feed and pet food. *Br. J. Nutr.* 93, S125.
- Vervaeke, I.J., Dierick, N.A., Demeyer, D.I., Decuypere, J.A., 1989. Approach to the energetic importance of fibre digestion in pigs. II. An experimental approach to hindgut digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.* 23, 169–194.
- Vince, A.J., Burridge, S.M., 1980. Ammonia production by intestinal bacteria: the effects of lactose, lactulose and glucose. *J. Med. Microbiol.* 13, 177–191.
- Vipperla, K., O’Keefe, S.J., 2012. The microbiota and its metabolites in colonic mucosal health and cancer risk. *Nutr. Clin. Pract.* 27, 624–635.
- Visek, W.J., 1984. Ammonia: its effects on biological systems, metabolic hormones, and reproduction. *J. Dairy Sci.* 67, 481–498.
- Vogt, B., Frey, F.J., 1997. Lactulose and renal failure. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 222, 100–101.
- Vuorisalo, T., Arjamaa, O., Vasemägi, A., Taavitsainen, J.-P., Tourunen, A., Saloniemi, I., 2012. High lactose tolerance in North Europeans: a result of migration, not in situ milk consumption. *Perspect. Biol. Med.* 55, 163–74.
- Walker, A.W., Ince, J., Duncan, S.H., Webster, L.M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M.D., Scott, P., Bergerat, A., Louis, P., McIntosh, F., Johnstone, A.M., Lobley, G.E., Parkhill, J., Flint, H.J., 2011. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J.* 5, 220–230.
- Wang, J.-K., Ye, J.-A., Liu, J.-X., 2012. Effects of tea saponins on rumen microbiota, rumen fermentation, methane production and growth performance--a review. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 697–706.
- Wang, R.F., Cao, W.W., Franklin, W., Campbell, W., Cerniglia, C.E., 1994. A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of *Clostridium perfringens* in food. *Mol. Cell. Probes* 8, 131–137.
- Wang, X., Parsons, C., 1998. Effect of raw material source, processing systems, and processing temperatures on amino acid digestibility of meat and bone meals. *Poult. Sci.* 77, 834–841.
- Warren, K.S., Newton, W.L., 1959. Portal and peripheral blood ammonia concentrations in germ-free and conventional guinea pigs. *Am. J. Physiol.* 197, 717–720.

- Wiernusz, C.J., Shields R.G., J., Van Vlierbergen, D.J., Kigin, P.D., Ballard, R., 1995. Canine nutrient digestibility and stool quality evaluation of canned diets containing various soy protein supplements. *Vet. Clin. Nutr.* 2, 49–56.
- Willard, M.D., Simpson, R.B., Cohen, N.D., Clancy, J.S., 2000. Effects of dietary fructooligosaccharide on selected bacterial populations in feces of dogs. *Am. J. Vet. Res.* 61, 820–825.
- Williams, E.A., Coxhead, J.M., Mathers, J.C., 2003. Anti-cancer effects of butyrate: use of micro-array technology to investigate mechanisms. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 107–115.
- Windey, K., De Preter, V., Verbeke, K., 2012. Relevance of protein fermentation to gut health. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 184–196.
- Xenoulis, P.G., Palculict, B., Allenspach, K., Steiner, J.M., Van House, A.M., Suchodolski, J.S., 2008. Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66, 579–589.
- Yamka, R.M., Jamikorn, U., True, A.D., Harmon, D.L., 2003. Evaluation of low-ash poultry meal as a protein source in canine foods. *J. Anim. Sci.* 81, 2279–2284.
- Yao, K., He, Q., Ying Jia, D., Shi, B., 2006. The potential of wattle tannin extracts for fine use. *Nat. Prod. Res.* 20, 271–278.
- Zacharias, B., Kerler, A., Drochner, W., 2004. The influence of 5% and 10% dietary apple pectin on parameters of fermentation in faeces and caecal digesta of weaning pigs. *Arch. Anim. Nutr.* 58, 149–156.
- Zaharia, V., Varzescu, M., Djavadi, I., Newman, E., Egnor, R.W., Alexander-Chacko, J., Charney, A.N., 2001. Effects of short chain fatty acids on colonic Na⁺ absorption and enzyme activity. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 128, 335–347.
- Ze, X., Duncan, S.H., Louis, P., Flint, H.J., 2012. *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *ISME J.* 6, 1535–1543.
- Zentek, J., 1995a. Influence of diet composition on the microbial activity in the gastro-intestinal tract of dogs. II. Effects on the microflora in the ileum chyme. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 74, 53–61.
- Zentek, J., 1995b. Influence of diet composition on the microbial activity in the gastro-intestinal tract of dogs. I. Effects of varying protein intake on the composition of the ileum chyme and the faeces. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 74, 43–52.
- Zentek, J., 1995c. Influence of diet composition on the microbial activity in the gastro-intestinal tract of dogs. III. In vitro studies on the metabolic activities

- of the small-intestinal microflora. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 74, 62–73.
- Zentek, J., Fricke, S., Hewicker-Trautwein, M., Ehinger, B., Amtsberg, G., Baums, C., 2004. Dietary Protein Source and Manufacturing Processes Affect Macronutrient Digestibility, Fecal Consistency, and Presence of Fecal *Clostridium perfringens* in Adult Dogs. *J. Nutr.* 134, 2158S–2161.
- Zentek, J., Kaufmann, D., Pietrzak, T., 2002a. Digestibility and effects on fecal quality of mixed diets with various hydrocolloid and water contents in three breeds of dogs. *J. Nutr.* 132, 1679S–1681S.
- Zentek, J., Marquart, B., Pietrzak, T., 2002b. Intestinal effects of mannanoligosaccharides, transgalactooligosaccharides, lactose and lactulose in dogs. *J. Nutr.* 132, 1682S–1684.
- Zentek, J., Marquart, B., Pietrzak, T., Ballevre, O., Rochat, F., 2003. Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 87, 397–407.
- Zentek, J., Mischke, R., 1997. Soya and casein as dietary proteins for dogs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 77, 139–148.
- Zentek, J., Steen, I., Rohde, J., Amtsberg, G., 1998. Dietary effects on the occurrence and enterotoxin production of *Clostridium perfringens* in the canine gastrointestinal tract. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 80, 250–252.