



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

Corso di Dottorato in Scienze Veterinarie XXXVIII Ciclo
Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa Cristina Cravana
Curriculum Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

**Le piume di pollo idrolizzate: un modello di filiera
sostenibile nel mercato del petfood.
Formulazione, preparazione e validazione di mangimi
innovativi mediante lo studio delle performance, del
microbiota fecale e della digeribilità apparente dei
nutrienti in cani adulti.**

Tesi di Dottorato di: Rosangela Armone

Tutor: Prof. ssa Biagina Chiofalo

Co-Tutor: Dott.ssa Marianna Oteri

Settore Scientifico Disciplinare: AGRI-09/B Nutrizione e alimentazione animale

Anno accademico 2024/2025

A mio figlio.

INDICE

ABSTRACT	5
1. INTRODUZIONE	7
1.1 ECONOMIA CIRCOLARE E SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE	7
1.2 FONTI PROTEINICHE ALTERNATIVE IN ALIMENTAZIONE ANIMALE	9
1.3 IL PROCESSO DI RENDERING PER IL RECUPERO DEI SOTTOPRODOTTI DI ORIGINE ANIMALE	11
1.4 PET, NUTRIZIONE E ECONOMIA CIRCOLARE	13
1.5 FONTI PROTEICHE E DIGERIBILITÀ NEI PET	18
<i>1.5.1 Acidi grassi volatili</i>	19
<i>1.5.2 Ammine Biogene</i>	20
1.6 MICROBIOTA E MICROBIOMA DEL CANE	24
<i>1.6.1 Fattori che influenzano il microbiota del cane</i>	28
<i>1.6.1.1 Età</i>	28
<i>1.6.1.2 Sesso</i>	30
<i>1.6.1.3 Dieta</i>	32
1.7 FONTI PROTEICHE ALTERNATIVE NELL'ALIMENTAZIONE DEI PET: I SOTTOPRODOTTI DELLA FILIERA AVICOLA	35
1.8 PIUME DI POLLO IDROLIZZATE	37
2. OBIETTIVO DELLA TESI	40
3. MATERIALI E METODI	43
3.1 DIETE SPERIMENTALI	43
<i>3.1.1 Analisi Chimiche delle diete sperimentali e della farina di piume idrolizzate</i>	45
3.2 GLI ANIMALI	48
<i>3.2.1 Trial 1</i>	54
<i>3.2.2 Trial 2</i>	54
3.3 DISEGNO SPERIMENTALE	55
<i>3.3.1 Trial 1</i>	55
<i>3.3.2 Trial 2</i>	57
3.4 RACCOLTA DELLE FECI E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI FECALI	58
<i>3.4.1 Preparazione del campione fecale per le analisi del microbiota</i>	58
<i>3.4.2 Preparazione del campione fecale per le analisi della digeribilità apparente</i>	58
<i>3.4.3 Preparazione del campione fecale per le analisi dei prodotti della fermentazione</i>	59
3.5 ANALISI DEL MICROBIOTA	59
3.6 DIGERIBILITÀ APPARENTE	60
3.7 ANALISI DEGLI ACIDI GRASSI VOLATILI	60
3.8 ANALISI DELLE AMMINE BIOGENE	61
3.9 ANALISI STATISTICA	62
<i>3.9.1 Analisi statistica del contenuto in amminoacidi e ammine biogene delle diete sperimentali</i>	62
<i>3.9.2 Trial 1: Analisi statistica delle performances</i>	62

3.9.3 Trial 1: Analisi statistica del microbiota	62
3.9.4 Trial 1: Analisi statistica della digeribilità e dei prodotti della fermentazione	63
3.9.5 Trial 2: Analisi statistica delle performances	63
3.9.6 Trial 2: Analisi statistica del microbiota	64
3.9.7 Trial 2: Analisi statistica della digeribilità e dei prodotti della fermentazione	64
4. RISULTATI	65
4.1 DIETE	65
4.1.1 Amminoacidi	65
4.1.2 Ammine biogene	65
4.2 PERFORMANCE ZOOTECHNICHE	66
4.2.1 Trial 1	66
4.2.2 Trial 2	69
4.3 MICROBIOTA	70
4.3.1 Trial 1	70
4.3.2 Trial 2	78
4.4 DIGERIBILITA' APPARENTE	85
4.4.1 Trial 1	85
4.4.2 Trial 2	86
4.5 PRODOTTI DELLA FERMENTAZIONE	89
4.5.1 Acidi Grassi Volatili	89
4.5.1.1 Trial 1	89
4.5.1.2 Trial 2	89
4.5.2 Ammine biogene	92
4.5.2.1 Trial 1	92
4.5.2.2 Trial 2	92
5. DISCUSSIONI	95
5.1 PERFORMANCE ZOOTECHNICHE	95
5.1.1 Trial 1	95
5.1.2 Trial 2	96
5.2 MICROBIOTA	97
5.2.1 Trial 1	97
5.2.2 Trial 2	99
5.3 DIGERIBILITA' APPARENTE	102
5.3.1 Trial 1	102
5.3.2 Trial 2	104
5.4 PRODOTTI DELLA FERMENTAZIONE	106
5.4.1 Acidi Grassi Volatili	106
5.4.1.1 Trial 1	106
5.4.1.2 Trial 2	108
5.4.2 Ammine biogene	110
5.4.2.1 Trial 1	110
5.4.2.2 Trial 2	112
6. CONCLUSIONI	114
7. BIBLIOGRAFIA	117
RINGRAZIAMENTI	153

ABSTRACT

Introduction

Growing interest in sustainability within the pet food sector has increased the demand for alternative protein sources derived from animal by-products, aligned with circular economy principles. Hydrolysed feather meal (HFM) represents a promising option due to its high availability, though it is characterised by nutritional limitations and moderate biological value. While hydrolysis enhances amino acid availability, the digestibility of HFM remains variable, and its effects on gastrointestinal health and colonic fermentation in dogs are not yet fully understood.

Aim

These studies evaluated the impact of a diet containing HFM compared with a poultry meal (PM)-based diet on dog performances, faecal quality, fermentation metabolites, and, additionally, on the composition and stability of the intestinal microbiota.

Materials and Methods

Two complete extruded diets were tested: a test diet containing 7% HFM and a reference diet based on PM, formulated with similar ingredients, additives, and nutrient profiles. To assess animal performance (BW, BCS, MCS, FCS), digestibility, faecal characteristics (organic acids and biogenic amines), and microbiota composition, two trials were conducted.

Trial 1

A cross-over study was performed on six adult female English setter dogs allocated into two homogeneous groups. The experimental design consisted of two 45-day feeding periods (R1 and R2), separated by a 30-day washout and preceded by a 7-day dietary adaptation.

Trial 2

A second study was carried out on eight adult English setter dogs (four females and four males), divided into two homogeneous groups: treated (TRT) and control (CTR) groups. The experimental design consisted of a 45-day feeding period.

Discussion

The inclusion of 7% HFM was well accepted and did not impair animal performance. Faecal consistency remained within the optimal range, and concentrations of organic acids and biogenic amines indicated the maintenance of gastrointestinal health. Microbiota analysis showed diet-related shifts in specific bacterial taxa; however, overall microbial diversity and composition remained consistent with a healthy intestinal ecosystem.

Conclusions

In conclusion, partial replacement of poultry meal with hydrolysed feather meal did not negatively affect dog performances, faecal quality, microbial metabolites, or gut microbiota balance, supporting the potential of HFM as a sustainable alternative protein source in canine nutrition. Further research is needed to investigate digestibility, the influence of different processing methods, and dose–response effects. This research was supported by the Project “BIO = C = O”, PON-MISE I&C 2014–2020 FESR, ASSE 6 REACT Priorità di investimento 13.i Azione I, funded as part of the European Union’s response to the COVID-19 pandemic. Project codex N. F/200078/03/X45, CUP B41B20000280005.

1. INTRODUZIONE

1.1 ECONOMIA CIRCOLARE E SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

L'economia circolare è un modello ideato per promuovere la crescita economica attraverso una gestione più efficiente delle risorse naturali, minimizzando al contempo la produzione di rifiuti (Korhonen et al., 2018). Numerosi processi industriali generano ingenti quantità di scarti; tra questi, le industrie di trasformazione alimentare risultano spesso poco efficaci nel ridurre, riutilizzare e riciclare i residui alimentari (Griffin et al, 2009; FAO, 2015; Gong et al., 2016). La FAO definisce lo spreco alimentare come qualsiasi cibo idoneo al consumo umano ma che viene scartato o destinato a usi non alimentari, sia per scelta del produttore/rivenditore, sia perché è andato a male o è scaduto per negligenza (FAO, 2015).

Secondo le stime delle Nazioni Unite, la popolazione mondiale potrebbe raggiungere i 9 miliardi di individui entro il 2050 (Zulfiqar et al., 2020), con un conseguente aumento della pressione sui sistemi alimentari globali. Tra le principali implicazioni, si prevede una crescita significativa della domanda di alimenti, in particolare di quelli di origine animale, il cui consumo potrebbe aumentare fino al 50%. Per affrontare efficacemente questa sfida globale, sarà fondamentale puntare su nuove risorse alimentari che siano sostenibili e in grado di soddisfare i fabbisogni nutrizionali di una popolazione in continua espansione (Pereira et al., 2022). Parallelamente alla crescita demografica, si registra un aumento significativo della produzione globale di rifiuti. Per far fronte a questa criticità, sono stati sviluppati numerosi approcci finalizzati alla valorizzazione degli scarti e dei sottoprodotti. Tali strategie si basano sul concetto di recupero e riciclo, con l'obiettivo di ridurre l'impatto ambientale associato alla produzione, trasformazione e smaltimento delle risorse.

In questo contesto si inserisce il concetto di sostenibilità, definito dall'Environmental Protection Agency (EPA) come la capacità di sviluppare un sistema equilibrato e produttivo, in cui l'essere umano e la natura possano coesistere in armonia (Fiksel et al., 2012). Tale equilibrio deve consentire la soddisfazione dei bisogni sociali ed economici attuali, senza compromettere la capacità delle generazioni future di soddisfare i propri (Fiksel et al., 2012; Acuff et al., 2021). Per valutare con precisione l'impatto ambientale di un sistema produttivo si adotta il metodo del Life Cycle Assessment (LCA). Questa metodologia analitica prende in considerazione tutti

gli input materiali, come l'energia e le risorse naturali, e gli output, come emissioni e rifiuti, generati lungo l'intero ciclo di vita di un prodotto o processo. Il metodo LCA rappresenta uno strumento fondamentale per le aziende, in quanto consente di prendere decisioni strategiche orientate alla sostenibilità (Acuff et al., 2021).

Per questi motivi, l'economia circolare si pone come un modello alternativo al tradizionale sistema lineare "produzione-uso-smaltimento". Le sue basi risiedono nel principio delle 3R ovvero, riduzione, riutilizzo e riciclaggio (Ellen MacArthur Foundation, 2013), che mirano a ridurre il consumo di risorse vergini e a minimizzare gli sprechi, convertendo ogni sottoprodotto in una nuova risorsa e contribuendo così a ridurre l'impatto ambientale complessivo (Santeramo, 2022).

Il settore agroalimentare, incluso quello zootecnico e mangimistico, può trarre notevoli benefici da questo approccio. Infatti, attraverso la rigenerazione degli scarti e il loro reimpiego nella produzione di nuovi alimenti o mangimi funzionali, è possibile trasformare i residui biologici in risorse preziose, classificate come materie prime secondarie (Chiofalo et al., 2016).

Un elemento fondamentale da chiarire riguarda la distinzione tra "scarto" e "sottoprodotto", così come definita dalla Direttiva Europea 2008/98/CE. Per "scarto" si intende qualsiasi sostanza o oggetto di cui il detentore si disfa, o intenda o debba disfarsi. Il "sottoprodotto", invece, è un materiale che deriva da un processo produttivo, ma il cui ottenimento non rappresenta lo scopo principale del processo stesso. La filiera agroalimentare è uno dei settori che genera la maggiore quantità di scarti e sottoprodotti e, secondo le stime dell'Unione Europea, ogni anno vengono sprecati circa 60 milioni di tonnellate di alimenti (132 kg/abitante), corrispondenti a circa il 10% della produzione totale (Eurostat, 2024). Ridurre tale quota rappresenta una priorità.

In tale contesto, una quota significativa dei sottoprodotti di origine animale, nonostante l'elevato valore nutrizionale, non viene destinata al consumo umano, ma potrebbe essere efficacemente impiegata in alimentazione animale, contribuendo così a una gestione più sostenibile delle risorse. Ai sensi dell'articolo 3 del Regolamento (CE) n. 1069/2009, i sottoprodotti di origine animale sono definiti come "corpi interi o parti di animali, prodotti di origine animale o altri prodotti derivati da animali che non sono destinati al consumo umano".

Per raggiungere questo obiettivo sono state adottate diverse strategie a livello internazionale, europeo e nazionale. A partire dal 2015, l'Agenda 2030 delle Nazioni Unite ha fissato un traguardo ambizioso: dimezzare lo spreco alimentare globale pro capite entro il 2030. In ambito europeo, il Green Deal rappresenta il piano d'azione volto a trasformare l'Unione Europea in un'economia moderna, efficiente nell'uso delle risorse e a impatto climatico zero entro il 2050. Per accelerare questa transizione, l'UE ha introdotto il Circular Economy Action Plan, che promuove un utilizzo sostenibile delle risorse naturali, mirando a prevenire il degrado ambientale e a preservare gli ecosistemi. A livello nazionale, il tema della sostenibilità e della circolarità in agricoltura è stato integrato nel Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza (PNRR) 2021–2026, che definisce le linee guida per l'utilizzo dei fondi europei del Next Generation EU. Una delle missioni del PNRR, "Agricoltura Sostenibile ed Economia Circolare", evidenzia l'intento di promuovere l'impiego di materie prime secondarie, derivate da residui, scarti o rifiuti, anche nel settore agroalimentare e mangimistico (Lazzi, 2022).

1.2 FONTI PROTEICHE ALTERNATIVE IN ALIMENTAZIONE ANIMALE

La crescente necessità di garantire un approvvigionamento alimentare adeguato a una popolazione mondiale in costante aumento, che, come già ribadito, secondo le previsioni della Food and Agriculture Organization (FAO, 2019) potrebbe raggiungere i 9,8 miliardi entro il 2050, impone di affrontare una delle principali sfide del nostro tempo: individuare fonti proteiche sostenibili e di elevata qualità. Secondo le stime, la produzione di carne (pollame, suini e bovini) quasi raddoppierà. Le fonti proteiche oggi più diffuse derivano prevalentemente da animali e sono apprezzate per il loro valore nutrizionale e le loro proprietà tecnologiche. Tuttavia, la loro produzione su larga scala comporta un notevole impiego di risorse naturali e un impatto ambientale significativo (Reijnders & Soret, 2003). Queste criticità richiedono l'adozione di strategie innovative, non solo nella selezione delle specie da allevare, ma anche nelle tecniche produttive, affinché sia possibile conciliare qualità nutrizionale, benessere animale e tutela dell'ambiente. Parallelamente, studi sottolineano come la connessione tra alimentazione, salute e sostenibilità stia diventando sempre più centrale (Caron et al., 2018).

Le proteine, oltre a essere nutrienti essenziali per i processi di crescita, riparazione e mantenimento dell'organismo (Brody, 1999), giocano un ruolo cruciale anche nella struttura e funzionalità degli alimenti. In questo contesto, la ricerca scientifica è chiamata a esplorare nuove fonti proteiche che valorizzino la biodiversità e promuovano la sostenibilità ambientale, sociale ed economica, sia nelle produzioni animali terrestri che in quelle acquatiche (Chiofalo et al., 2024). Le attività di ricerca si stanno dunque concentrando sull'identificazione e lo sviluppo di fonti proteiche alternative in grado di fornire un apporto nutrizionale adeguato, con un impatto ambientale inferiore rispetto alle fonti tradizionali.

Il significato attribuito al concetto di “proteine alternative” può variare notevolmente a seconda del contesto geografico. In Europa, ad esempio, il termine assume un'accezione diversa rispetto all'Africa subsahariana, dove l'alimentazione si basa prevalentemente su proteine di origine vegetale anziché animale. Per questo motivo, appare necessario adottare una definizione più inclusiva, che non si limiti a escludere le proteine animali e che, ad esempio, non escluda a priori gli insetti come fonte proteica alternativa (Sans & Combris, 2015). Una possibile definizione potrebbe essere la seguente: *le proteine alternative sono tutte quelle proteine ottenute da fonti caratterizzate da un basso impatto ambientale, che mirano a sostituire le fonti convenzionali.* (Grossmann & Weiss, 2021). In questa prospettiva, assumono particolare rilevanza le proteine estratte da piante terrestri, alghe, funghi e insetti. Queste fonti si distinguono non solo per il loro ridotto impatto ecologico, ma anche, nel caso degli insetti, per la possibilità di sviluppare pratiche di allevamento compatibili con il rispetto del benessere animale (Dossey et al., 2016; Clune et al., 2017; Dobermann et al., 2017). Tuttavia, in ambito industriale, la disponibilità in grandi volumi di materia prima può risultare più strategica del solo contenuto proteico, rendendo economicamente vantaggioso anche l'uso di materiali meno concentrati (Azzollini et al., 2019). Inoltre, molte proteine alternative provengono da sottoprodotti di processi industriali finalizzati all'estrazione di amidi o oli, che fino a poco tempo fa erano destinati ad applicazioni a basso valore, come i mangimi (Smetana et al., 2018). Inoltre, la crescente richiesta di proteine animali per uso zootecnico pone ulteriori sfide a livello globale. Questo aumento della produzione aggrava la pressione sulle risorse naturali e intensifica la competizione per le materie prime proteiche (FAO, 2019). Il

mercato europeo, in particolare, dipende fortemente dalle importazioni di soia, principale fonte proteica per i mangimi, la cui coltivazione è tuttavia limitata da vincoli territoriali (Commissione Europea, 2018). Le fonti proteiche attualmente più utilizzate sono il mais, la farina di soia, la farina di girasole e il pannello di colza. Tuttavia, specie vegetali tipiche di determinate aree, come fave, piselli, lenticchie, canapa e semi di cereali, possono offrire un'alternativa economicamente vantaggiosa, soprattutto per i piccoli produttori, purché prive di fattori antinutrizionali e accessibili economicamente. Anche per la nutrizione animale, la ricerca scientifica sta approfondendo l'utilizzo di fonti proteiche alternative di origine animale, tra cui insetti, vermi, lumache e organismi marini (alghe, crostacei, stelle marine), che offrono un buon profilo amminoacidico (soprattutto lisina e metionina), oltre a un apporto di energia e minerali (calcio e fosforo disponibile) (Miller, 2004).

1.3 IL PROCESSO DI RENDERING PER IL RECUPERO DEI SOTTOPRODOTTI DI ORIGINE ANIMALE

In un'ottica di economia circolare e sostenibilità ambientale, il recupero e la valorizzazione dei sottoprodotti di origine animale tramite il processo di rendering rappresentano una soluzione strategica per ridurre gli sprechi e produrre proteine e grassi di elevato valore nutrizionale.

Il termine “impianto di rendering” si riferisce a strutture in cui gli scarti di origine animale vengono trasformati in materiali stabili attraverso un processo termico e meccanico. In generale, il rendering comprende l'insieme delle tecniche utilizzate per convertire i sottoprodotti animali in prodotti di maggiore valore nutrizionale ed economico, con particolare attenzione alla trasformazione del tessuto adiposo in grassi purificati, come strutto o sego. Questi processi possono essere applicati su scala industriale, agricola o persino domestica e, in alcuni casi, possono includere anche materiali organici di origine non animali. Il processo di base prevede l'essiccazione della materia prima e la successiva separazione delle componenti lipidiche da quelle proteiche e ossee, con il risultato finale di grassi e farine proteiche (SunRise, 2023).

Gli impianti di rendering svolgono quindi un ruolo fondamentale nella trasformazione di rifiuti organici, sottoprodotti animali e scarti alimentari in materiali ad alto valore, contribuendo significativamente alla riduzione dell'impatto ambientale. Sebbene in passato queste strutture fossero considerate impattanti anche dal punto di

vista estetico, oggi il loro ruolo è riconosciuto come cruciale nel recupero efficiente delle risorse. Gli impianti di rendering trattano carcasse e sottoprodotti animali per ottenere ingredienti come sego, grasso di pollo, farine di carne e ossa. Questi materiali sono impiegati in numerosi settori, tra cui la produzione alimentare, cosmetica e industriale, oltre che per la realizzazione di saponi, colle e fertilizzanti (SunRise, 2023).

I materiali trattati provengono principalmente dagli scarti dei macelli, ma possono includere anche grassi recuperati da ristoranti, residui di macelleria o carne non più idonea al consumo umano proveniente da supermercati. Le materie prime più comuni comprendono tessuti adiposi, ossa e frattaglie di animali macellati. Le specie più frequentemente coinvolte in questo processo sono bovini, suini, ovini e pollame (SunRise, 2023).

Un esempio specifico e sempre più rilevante è rappresentato dal rendering dei sottoprodotti avicoli. In questo contesto, materiali come piume, teste, zampe e organi interni, solitamente non destinati al consumo diretto, vengono trasformati in prodotti utili come farina di pollo e grasso di pollo. L'obiettivo è duplice: da un lato, valorizzare componenti ad alto valore nutrizionale, dall'altro, ridurre la quantità di rifiuti generati e il loro impatto ambientale.

Due sono i principali metodi impiegati: il rendering a secco e quello a umido. Il primo prevede l'utilizzo di calore in assenza di umidità per separare le componenti lipidiche e proteiche, ottenendo così farine e grassi. Il secondo, noto anche come rendering a pressione, utilizza vapore e pressione per scomporre i materiali organici, risultando particolarmente efficace per i sottoprodotti ad alto contenuto di umidità, come piume e frattaglie. In entrambi i casi, i derivati finali trovano impiego nella produzione di mangimi, alimenti per animali domestici e altre applicazioni industriali (SunRise, 2023).

Il ciclo produttivo del rendering avicolo inizia con la raccolta e la selezione accurata dei sottoprodotti. Questi materiali vengono quindi sottoposti a una fase di cottura, che consente la sterilizzazione e la separazione delle componenti solide e liquide. Le prime vengono successivamente pressate per ottenere farine, mentre dalle seconde si ricava il grasso. Una fase successiva di essiccazione e raffreddamento garantisce la conservabilità e la stabilità dei prodotti, sino ad ottenere un'umidità

residua adeguata agli standard richiesti. A completamento del ciclo, i prodotti ottenuti vengono confezionati in base alla destinazione d'uso. Che si tratti di mangimi zootecnici, alimenti per animali domestici o impieghi industriali, il packaging è progettato per garantire igiene, sicurezza e praticità nella distribuzione (SunRise, 2023).

Dal punto di vista economico e ambientale, il rendering si rivela una pratica estremamente vantaggiosa. Oltre a produrre un'ampia gamma di materiali commerciabili, permette di contenere i costi rispetto ad altri metodi di produzione di grassi e proteine animali, riducendo significativamente la quantità di rifiuti da smaltire in discarica o tramite incenerimento. Per questi motivi, rappresenta una soluzione sostenibile, economicamente accessibile anche alle piccole imprese, e un elemento chiave per promuovere modelli produttivi più responsabili ed efficienti (SunRise, 2023).

Analisi di Life Cycle Assessment (LCA) dimostrano come il rendering presenti un impatto ambientale complessivamente inferiore rispetto ad altre forme di gestione dei sottoprodotti animali, grazie al recupero di proteine e grassi e alla riduzione dei rifiuti da smaltire. Studi europei e nordamericani mostrano che il rendering presenta un impatto ambientale complessivamente inferiore rispetto ad altre opzioni di gestione dei sottoprodotti, con benefici significativi in termini di emissioni evitate e recupero di nutrienti (Ramirez et al., 2012; Gooding, 2013; Campos et al., 2020).

1.4 PET, NUTRIZIONE E ECONOMIA CIRCOLARE

Nel settore del pet food la valorizzazione di ingredienti altrimenti inutilizzati rappresenta un'opportunità concreta per ridurre lo spreco e promuovere un modello produttivo più circolare e rispettoso dell'ambiente.

Negli ultimi decenni, il ruolo degli animali domestici come veri e propri membri della famiglia è diventato sempre più centrale, specialmente nei paesi industrializzati (Shepherd, 2008). La riduzione del numero di componenti familiari ha contribuito a rafforzare il legame tra esseri umani e animali, che non sono più visti solo come compagni, ma anche come parte integrante della sfera affettiva e psicologica della famiglia (Arluke & Rowan, 2020). Numerosi studi scientifici hanno evidenziato i molteplici benefici che la compagnia di un animale domestico, come un cane o un

gatto, può apportare alla salute mentale e fisica dei proprietari (Serpell, 1991; Beetz et al., 2012; Powell et al., 2019). In particolare, la presenza di un animale da compagnia rappresenta una fonte significativa di supporto emotivo, capace di alleviare ansia, depressione e stress, specialmente in situazioni di isolamento o forte pressione psicologica (Beetz et al., 2012). L'interazione con gli animali favorisce inoltre il rilascio di ossitocina, ormone associato alla riduzione dello stress e al benessere emotivo, contribuendo a una maggiore stabilità psicologica (Beetz et al., 2012). Oltre agli effetti psicologici, il contatto con un animale domestico è stato associato a una diminuzione della pressione sanguigna e della frequenza cardiaca nei momenti di tensione, con un impatto positivo sulla salute cardiovascolare (Friedmann & Thomas, 1995; Furst, 2006; Powell et al., 2019). Accanto ai benefici psicofisici, la compagnia di un animale domestico può influire positivamente anche sulle dinamiche sociali. Gli animali favoriscono la creazione di legami tra individui, facilitando le interazioni interpersonali e promuovendo sentimenti di fiducia, rispetto ed empatia (Beetz et al., 2012; Powell et al., 2018; Powell et al., 2019). I cani, in particolare, grazie alle passeggiate quotidiane, favoriscono la socializzazione, aiutando a ridurre la solitudine e a promuovere uno stile di vita più attivo (Di Cerbo et al., 2017).

L'importanza della relazione tra essere umano e animale ha suscitato un crescente interesse per l'impiego degli animali domestici in programmi terapeutici, come la pet therapy, rivelatasi efficace nel supporto a persone con disabilità, anziani e individui affetti da disturbi psicologici (Lowry & Ryan, 1993; Le Roux & Kem, 2009; Beetz et al., 2012). Tuttavia, la relazione tra umani e animali è bidirezionale: lo stato emotivo e psicofisico del proprietario influisce sul benessere dell'animale, con evidenze che lo stress umano può compromettere l'attenzione e il comportamento degli animali (Kaminski et al., 2009; Sumegi et al., 2014; Buttner et al., 2015; Payne et al., 2016; Ryan et al., 2019).

La crescente consapevolezza del ruolo degli animali nella vita quotidiana ha portato molti proprietari a investire in una cura sempre più attenta, garantendo alimentazione adeguata e assistenza veterinaria di qualità (Buchanan et al., 2011). Nel contesto italiano (Rapporto Assalco-Zoomark, 2025), l'analisi del 2024 mostra un incremento di circa 5 milioni di animali domestici rispetto al 2019, confermando una crescita continua favorita da un'attenzione maggiore al benessere animale e da

cambiamenti nelle abitudini, in particolare durante e dopo la pandemia (Figura 1). L'emergenza COVID-19 ha infatti accentuato il valore emotivo degli animali, che hanno offerto supporto psicologico e compagnia in momenti di isolamento e difficoltà (Ho et al., 2021).

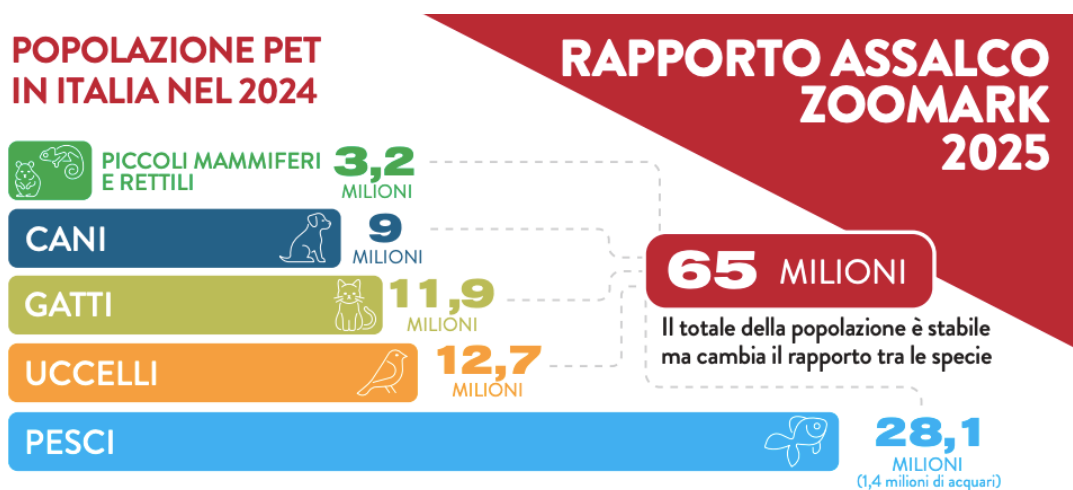


Figura 1 – Popolazione dei pet in Italia nel 2024 (Rapporto Assalco-Zoomark 2025).

Secondo il Rapporto Assalco-Zoomark 2025, la popolazione di cani in Italia ha raggiunto i 9 milioni, mentre quella dei gatti ha superato i 10 milioni, confermandoli come gli animali da compagnia più diffusi. Tuttavia, anche altre specie, come pesci (quasi 30 milioni), uccelli (12,7 milioni) e piccoli mammiferi e rettili, testimoniano una crescente diversificazione nelle preferenze degli italiani. Questa espansione comporta importanti implicazioni economiche, soprattutto nel mercato del pet food, nelle esigenze veterinarie e nella gestione quotidiana degli animali nelle famiglie (Assalco-Zoomark, 2025).

Il settore del pet food, quindi, rappresenta un ambito rilevante per l'adozione di strategie sostenibili e circolari. In Italia, nel 2024, il mercato del pet food ha raggiunto un fatturato complessivo di 3,1 miliardi di euro. I prodotti per gatti costituiscono la quota maggiore del mercato, con un fatturato pari a 1.758 milioni di euro, che rappresentano il 56,3% del totale; seguono i prodotti per cani con 1.367 milioni di euro (Rapporto Assalco-Zoomark 2025). Il cibo per cani e gatti continua a guadagnare spazio sugli scaffali, rispecchiando le tendenze che stanno trasformando

l'alimentazione umana. Il comparto è sempre più orientato al miglioramento qualitativo e ambientale dell'offerta, con una crescente presenza di alimenti formulati secondo criteri salutistici e sostenibili. Le etichette dei prodotti per animali domestici riportano sempre più spesso indicazioni legate a questi valori. Secondo i dati raccolti dall'Osservatorio Immagino di GS1 Italy, nel settore dell'alimentazione per cani e gatti sono preseti 1.917 referenze con etichette che dichiarano l'assenza di specifici ingredienti, additivi o nutrienti. Questo ampio insieme di prodotti, comunemente definito "free from", rappresenta oltre la metà delle proposte presenti a scaffale e ha generato un sell-out di quasi 645 milioni di euro, registrando una crescita annua del +6,8%, nonostante un calo nei volumi venduti pari al -1,7%. Il quadro delineato dai dati dell' Osservatorio mostra come i claims "free from" abbiano assunto un ruolo centrale nelle strategie di marketing del pet food. La presenza di quasi duemila referenze che dichiarano l' assenza di determinati ingredienti o additivi evidenzia una crescente attenzione dei proprietari verso aspetti percepiti come salutistici e "puliti" dell' alimento. Tale sensibilità, spesso modellata dalle tendenze del settore alimentare umano, si riflette in un posizionamento commerciale che appare molto efficace: nonostante il calo dei volumi, questi prodotti continuano a generare crescita in valore, segno che il consumatore è disposto a pagare un premium price per caratteristiche considerate più sicure o naturali.

Tra le dichiarazioni più frequenti in etichetta figurano "senza coloranti" e "sugar free", mentre la dicitura "grain free/low grain" si distingue per la maggiore crescita in termini di valore, con un +18,7% annuo. Anche il claim "senza glutine" sta guadagnando spazio tra i consumatori: i 172 prodotti che lo riportano in etichetta hanno superato i 25 milioni di euro di vendite, con un incremento del +10,1% rispetto all'anno precedente, trainato in particolare dalla domanda dei proprietari. La prevalenza di claims come "senza coloranti" o "sugar free", insieme alla forte espansione del segmento "grain free/low grain", suggerisce che molte scelte d' acquisto siano guidate da convinzioni o aspettative più che da reali necessità nutrizionali dell' animale. In particolare, claim come "senza glutine", la cui rilevanza clinica nei cani è estremamente limitata, mostrano come la percezione del proprietario influenzi in modo marcato il mercato, portando a una crescente domanda

di prodotti formulati per rispondere a esigenze percepite, non sempre supportate da evidenze scientifiche.

Un trend parallelo è rappresentato dai prodotti “rich-in”, ovvero quelli che evidenziano in etichetta la presenza di sostanze benefiche per la salute. In questo ambito, l’Osservatorio ha individuato 1.913 referenze, che hanno superato i 557 milioni di euro di vendite, con una crescita annua del +4,9% a valore, a fronte di un calo del -3,2% nei volumi. I claim più diffusi sono “vitamine” e “proteine”, ma i tassi di crescita più rilevanti si registrano per le diciture “prebiotici” (+19,6%), “ricco in/ricco di” (+16,9%) e “ingredienti naturali” (+15,6%). Parallelamente, l’emergere e il consolidarsi dei claims “rich-in” riflettono un'altra dinamica importante: la ricerca non solo di alimenti “senza”, ma anche di alimenti “con”, ossia arricchiti o naturalmente ricchi di componenti ritenuti benefici (ad esempio, omega-3, vitamine specifiche, antiossidanti, fibre funzionali). Questo approccio sposta l’attenzione dalla semplice esclusione di ingredienti alla valorizzazione nutrizionale, presentando l’alimento come un supporto attivo al benessere dell’animale.

Nel complesso, la combinazione dei claim “free from” e “rich-in” indica una forte convergenza tra consumo umano e pet food, in cui la narrazione salutistica assume un peso crescente. Tuttavia, ciò sottolinea anche l’importanza di una lettura critica da parte dei proprietari e degli operatori del settore, affinché le scelte nutrizionali non siano guidate solo dal marketing, ma anche dalla reale adeguatezza dell’alimento ai fabbisogni dell’animale.

Un ulteriore fenomeno significativo è la valorizzazione dell’origine italiana dei prodotti. L’italianità è infatti richiamata in etichetta da 523 prodotti destinati all’alimentazione di cani e gatti, generando un valore di quasi 105 milioni di euro. In un solo anno, questo paniere ha registrato un aumento del +10,2% in termini di vendite e del +3,5% a volume, con un contributo più marcato da parte dei prodotti per cani. I simboli più utilizzati per comunicare l’origine nazionale sono la bandiera italiana e le diciture “prodotto in Italia” o “made in Italy”, entrambe in crescita sia a valore che a volume. Il claim con la performance più rilevante in termini di incremento del fatturato è “100% italiano”, che ha registrato un +13,6% (Osservatorio Immagino, 2024).

Nel complesso, il settore del pet food dimostra un’elevata capacità di adattamento ai principi della sostenibilità e dell’economia circolare, sia attraverso

l'innovazione di prodotto, sia mediante la valorizzazione dei sottoprodotti lungo la filiera. Questa transizione rappresenta non solo una risposta responsabile alle sfide ambientali globali, ma anche una concreta opportunità di sviluppo competitivo per le imprese.

1.5 FONTI PROTEICHE E DIGERIBILITÀ NEI PET

Nel contesto della ricerca di fonti proteiche alternative e sostenibili per l'alimentazione degli animali da compagnia, è fondamentale evidenziare il ruolo delle proteine e l'influenza che la loro origine può avere sulla digeribilità.

Le proteine svolgono un ruolo fondamentale nella dieta degli animali da compagnia, poiché apportano aminoacidi indispensabili, sia essenziali che non essenziali, necessari per lo sviluppo e il mantenimento del tessuto muscolare e per sostenere le funzioni metaboliche dell'organismo (Dust et al., 2005). Inoltre, rappresentano la principale fonte di azoto nell'organismo, elemento cruciale per la sintesi endogena di aminoacidi non essenziali e di composti azotati come nucleotidi, purine e pirimidine (Case et al., 2011).

Le fonti proteiche utilizzate nell'alimentazione dei pet derivano prevalentemente da sottoprodotti di origine animale, vegetale, o da miscele di entrambe le fonti (Case et al., 2011). Tra gli ingredienti di origine animale si annoverano comunemente farine di carne, ossa, pesce e pollame, oltre alle uova essiccate (Cramer et al., 2007). Per quanto riguarda le fonti vegetali, l'industria del pet food fa largo uso di farine di glutine di mais, soia, semi di lino, erba medica e germe di grano (Zentek & Mischke, 1997; Case et al., 2011). La qualità delle fonti proteiche impiegate influisce direttamente sulla digeribilità: ingredienti a basso valore proteico, spesso ricchi in collagene o sottoposti a trattamenti termici intensi, tendono ad avere una minore disponibilità digestiva (Zentek et al., 2003). I carboidrati rappresentano la fonte primaria di energia per i processi fermentativi del microbiota intestinale. Tuttavia, in situazioni in cui i carboidrati fermentabili risultano insufficienti o non disponibili, i microrganismi presenti nel tratto intestinale ricorrono a fonti alternative di carbonio, come le proteine non digerite provenienti dalla dieta, o le proteine endogene, tra cui mucine, enzimi secreti dal pancreas, cellule epiteliali desquamate e batteri lisati (Cummings & Macfarlane, 1991; Gibson & Roberfroid, 1995; Nery et al., 2012; Davila et al., 2013; Scott et al., 2013).

Studi su cani hanno evidenziato che, quotidianamente, tra 218 e 650 grammi di proteine per chilogrammo di sostanza secca presente nel lume intestinale possono arrivare al grosso intestino (Zentek, 1995). Tale quantità è influenzata da variabili quali, ad esempio, la digeribilità della fonte proteica (Wiernusz et al., 1995), la percentuale di inclusione nella dieta (Yamka et al., 2003) e l'assunzione totale di sostanza secca (Hussein & Sunvold, 2000).

Nel cane e nel gatto, come nella maggior parte dei mammiferi, il colon rappresenta il sito principale delle fermentazioni proteolitiche condotte dal microbiota. L'attività delle proteasi batteriche risulta massima in condizioni di pH neutro o leggermente alcalino (Macfarlane et al., 1988), situazione tipica del colon distale. In questa zona, inoltre, il transito intestinale più lento e la scarsa disponibilità di carboidrati favoriscono l'intensificazione della degradazione proteica (Cummings & Macfarlane, 1991). Le fermentazioni putrefattive che avvengono nel colon portano alla formazione di vari metaboliti, tra cui ammoniaca, amine biogene, fenolo, indolo, solfiti, acidi grassi ramificati e acidi grassi a catena corta, oltre a gas come idrogeno (H_2), anidride carbonica (CO_2) e metano (CH_4), e intermedi metabolici quali lattato e succinato (Cummings & Macfarlane, 1991; Hughes et al., 2000). Mentre gli acidi grassi a catena corta (SCFA) rappresentano una preziosa fonte di energia per le cellule epiteliali del colon, altri metaboliti (come ammine, fenolo e ammoniaca) sono potenzialmente tossici e, in alcuni casi, associati a effetti pro-infiammatori o cancerogeni per l'ospite (Macfarlane et al., 1988; Hussein et al., 1999; Mouillé et al., 1999; Nyangale et al., 2012; Davila et al., 2013; Salonen & de Vos, 2014).

1.5.1 Acidi grassi volatili

Gli SCFA sono acidi carbossilici caratterizzati dalla presenza di una catena alifatica composta da due a sei atomi di carbonio. Sebbene possano essere prodotti anche attraverso vie metaboliche endogene, in particolare nel fegato, la loro principale sede di produzione è il colon, dove la fermentazione delle fibre alimentari e degli amidi resistenti avviene grazie alla presenza di specifici batteri anaerobi del colon (Høverstad & Midtvedt, 1986). La fermentazione delle proteine nel colon produce una quantità inferiore di acidi grassi volatili rispetto a quella dei carboidrati, con conseguente minore apporto energetico per l'ospite (Macfarlane et al., 1992). I principali SCFA prodotti nel colon sono l'acetato (C2), il propionato (C3) e il butirato (C4). Il rapporto

molare medio di produzione tra acetato, propionato e butirrato è di circa 60:25:15, anche se tali proporzioni possono variare in base alla dieta, alla composizione del microbiota, al sito di fermentazione e al genotipo dell'ospite (Hamer et al., 2008; Tazoe et al., 2008). Dal punto di vista fisiologico, il butirrato viene principalmente utilizzato come fonte energetica dalle cellule epiteliali del colon (colonociti), mentre acetato e propionato raggiungono il fegato tramite la vena porta. Il propionato viene metabolizzato dagli epatociti, mentre l'acetato può essere trattenuto nel fegato oppure distribuito a livello sistemico (Tan, 2014).

La sintesi di SCFA coinvolge diverse vie metaboliche batteriche. La glicolisi rappresenta la via principale, ma alcune specie, come i *Bifidobatteri*, utilizzano anche la via del pentoso fosfato (Cronin et al., 2011; Macfarlane & Macfarlane, 2003). L'acetato è prodotto tramite la via di Wood–Ljungdahl, il propionato tramite fissazione del CO₂, e il butirrato dalla condensazione dell'acetil-CoA (Miller & Wolin, 1996; Fast & Papoutsakis, 2012). Alcuni generi specifici, come *Bifidobacterium*, utilizzano vie metaboliche alternative (Pokusaeva et al., 2011). Batteri acetogenici (come *Acetobacterium* e *Clostridium*) possono convertire il butirrato e il propionato in acetato, mentre batteri butirrogeni come *Faecalibacterium prausnitzii* e *Roseburia* possono compiere il processo inverso (Westermann et al., 1989; Duncan et al., 2004). Le interazioni microbiche sono cruciali: ad esempio, *Bacteroides thetaiotaomicron* può produrre acetato, che viene poi utilizzato da *Eubacterium rectale* per sintetizzare butirrato (Mahowald et al., 2009). Tali relazioni sono supportate anche da differenze nei sistemi di trasporto: i *Bacteroidetes* possiedono meno trasportatori (ABC, PTS) rispetto ai *Firmicutes*, ma più enzimi degradanti, mentre i *Firmicutes* risultano più efficaci nel convertire acetato in altri SCFA, suggerendo un equilibrio funzionale tra i due phyla.

Questa rete complessa di processi e interazioni evidenzia l'importanza della modulazione del microbiota attraverso l'uso di prebiotici e probiotici per regolare la produzione intestinale di SCFA (Tan, 2014).

1.5.2 Ammine Biogene

Le ammine biogene (AB) sono composti azotati derivanti dalla decarbossilazione microbica degli amminoacidi (AA) e dall'amminazione o transaminazione di chetoni e aldeidi, a seguito dell'azione di specifici enzimi prodotti

dai microrganismi (Suzzi & Torriani, 2015; Learey et al., 2018; Tabanelli, 2020; Martuscelli et al., 2021; Vasconcelos et al., 2021; Altafini et al., 2022, Schirone et al., 2022; Vasconcelos et al., 2022) (Figura 2). Possono essere suddivise in tre gruppi in base alla loro struttura chimica: ammine alifatiche (agmatina, cadaverina, putrescina, spermidina e spermina), ammine aromatiche (feniletilamina e tiramina) e ammine eterocicliche (istamina e triptamina) (EFSA, 2011; Li & Lu, 2020) (Figura 3). In base al numero di gruppi amminici presenti, le ammine biogene possono essere ulteriormente classificate in monoammine (come la feniletilamina e la tiramina) e poliammine (di-, tri- e tetra-ammine), che includono l'agmatina, l'istamina, la cadaverina, la putrescina, la spermidina, la spermina e la triptamina (Erdag et al., 2018).

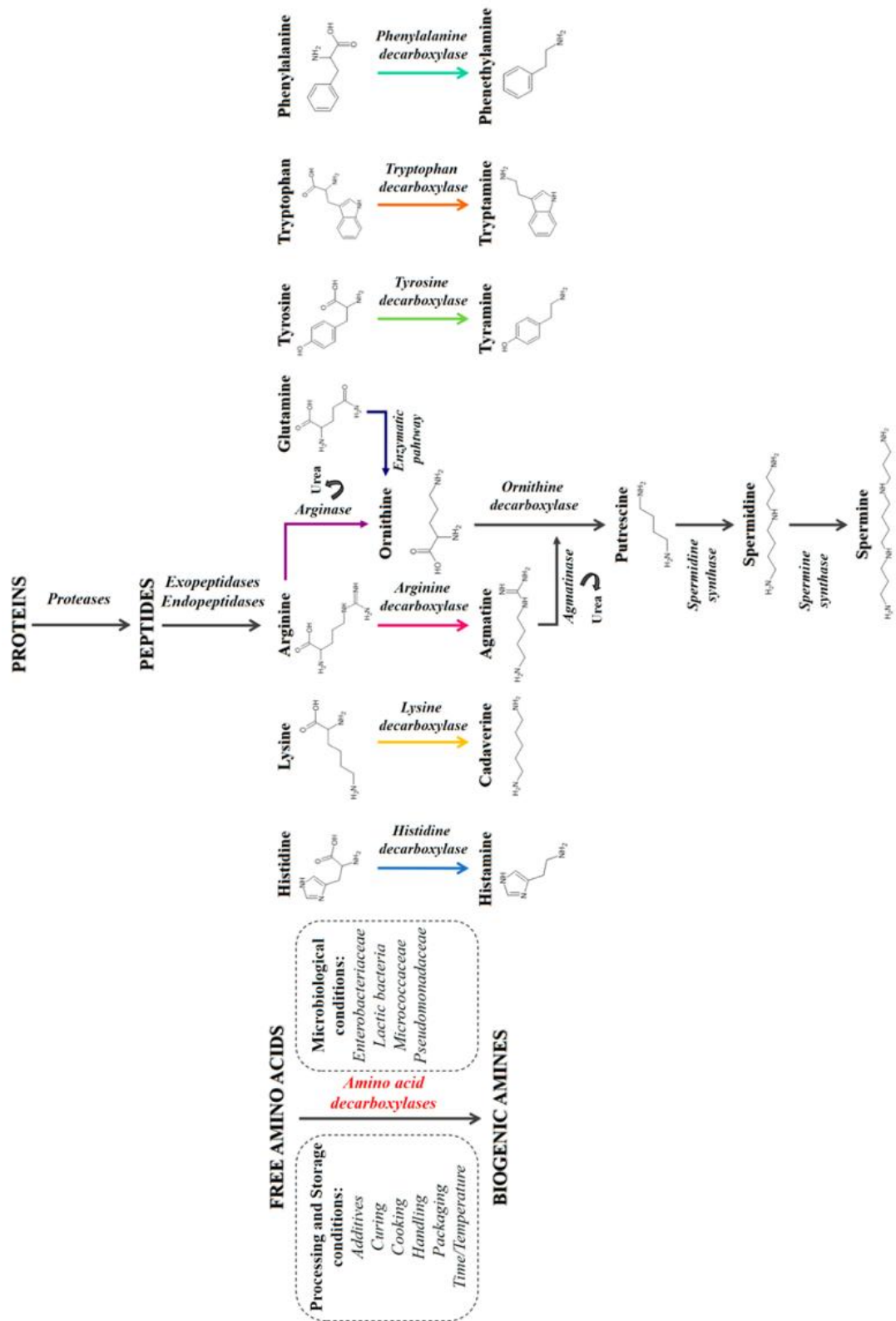


Figura 2 – Vie di degradazione degli aminoacidi che portano alla formazione di ammine biogene (Montegiove et al., 2023).

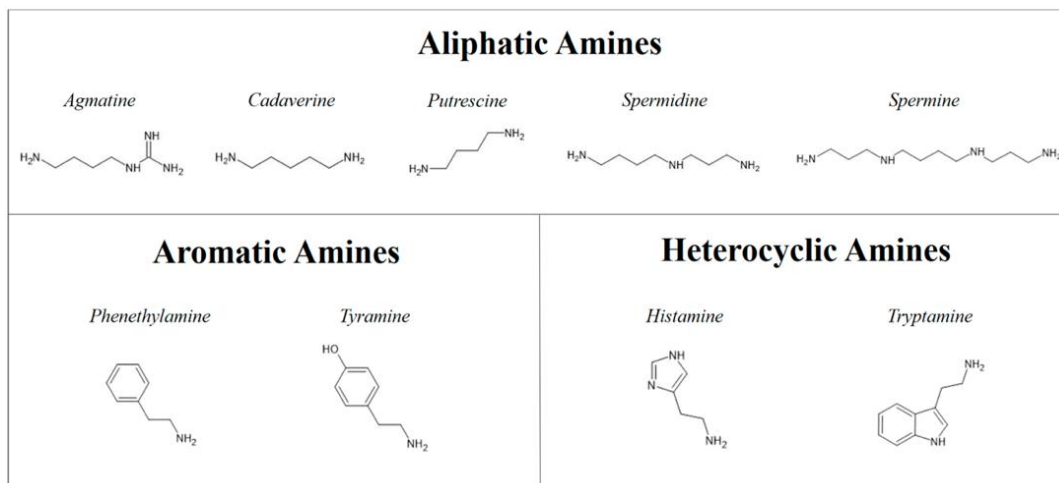


Figura 3 – Classificazione delle ammine biogene in base alla loro struttura chimica (Montegiove et al., 2023).

Le AB sono prodotte naturalmente sia negli animali che nell'uomo e partecipano a numerosi processi fisiologici fondamentali, tra cui la regolazione della pressione arteriosa, della temperatura corporea, del volume e del pH gastrico, nonché dell'attività neuronale (Ten Brink et al., 1990; EFSA, 2011).

Alcune di queste molecole, come la triptamina e la fenilettilamina, possono avere effetti positivi sulla salute: a concentrazioni fisiologiche, agiscono come neuromodulatori endogeni della neurotrasmissione monoaminergica centrale e come ammine simpaticomimetiche indirette, stimolando il rilascio di noradrenalina dalle terminazioni simpatiche (Berry, 2004; del Rio et al., 2020).

Tuttavia, l'assunzione di elevate quantità di alcune ammine biogene, in particolare istamina e tiramina, può provocare effetti tossici (Feddern et al., 2019). La loro formazione negli alimenti è favorita dalla presenza di aminoacidi liberi, da microrganismi dotati di attività decarbossilasica e da condizioni ambientali favorevoli, come temperature elevate e tempi di conservazione prolungati (Ten Brink et al., 1990; Ruiz-Capillas & Herrero, 2019). Per questo motivo, le AB sono utilizzate come indicatori di qualità e freschezza nei prodotti alimentari e nei mangimi, poiché riflettono il livello di contaminazione microbica e lo stato di deterioramento del prodotto (Feddern et al., 2019; Ruiz-Capillas & Herrero, 2019).

Nel settore della nutrizione animale, i sottoprodotti di origine avicola e della carne sono comunemente impiegati nella formulazione di alimenti per animali da compagnia. Tuttavia, se non correttamente gestiti lungo la filiera produttiva, questi ingredienti possono essere soggetti a deterioramento, diventando potenziali fonti di accumulo di ammine biogene (Feddern et al., 2019). Anche una produzione endogena di AB può verificarsi nell'intestino degli animali quando un eccesso di aminoacidi non digeriti viene metabolizzato dalla flora microbica in composti azotati tossici, tra cui ammoniaca e ammine (Fan et al., 2017). Oltre alla sintesi interna, l'apporto alimentare rappresenta una via importante di esposizione alle ammine biogene. La loro presenza negli alimenti è spesso legata a contaminazioni microbiche e alla proliferazione di microrganismi decarbossilasi-positivi. Se le concentrazioni superano una soglia critica, possono verificarsi effetti avversi sulla salute animale (Ladero et al., 2010).

Nella produzione di alimenti secchi per animali domestici, le materie prime più comunemente impiegate sono carni fresche e farine di carne, derivanti da sottoprodotti dell'industria alimentare non destinati al consumo umano (Montegiove et al., 2020; Thompson et al., 2008; Montegiove et al., 2021). Le farine di carne, in particolare, sono apprezzate per il loro elevato contenuto proteico e si ottengono tramite il processo di *rendering* (Thompson et al., 2008; Montegiove et al., 2021). Queste farine in assenza di adeguate pratiche igienico-sanitarie durante la produzione e la manipolazione, possono favorire la proliferazione microbica e la formazione di AB (FEDIAF, 2018; Leiva et al., 2019). La presenza di ammine biogene è stata documentata in snack e mangimi secchi per cani, sia confezionati che venduti sfusi, confermando il loro potenziale utilizzo come marker di contaminazione microbica e deterioramento (Girio et al., 2012; Kazimierska et al., 2021; Kępińska-Pacelik et al., 2021). Questi composti tendono ad accumularsi nel prodotto finale a seguito di trasformazioni enzimatiche, rappresentando un parametro utile per la valutazione della qualità e sicurezza degli alimenti per animali.

1.6 MICROBIOTA E MICROBIOMA DEL CANE

Nel corso degli ultimi decenni, la comunità scientifica ha mostrato un crescente interesse per la salute intestinale del cane, riconoscendola come un elemento fondamentale per il benessere generale dell'animale. Questo orientamento ha

alimentato un ampio corpus di ricerche incentrate sulla caratterizzazione della popolazione microbica intestinale canina. Il tratto gastrointestinale dei mammiferi ospita un ecosistema microbico estremamente complesso, denominato microbiota, che comprende tra i 10^{12} e i 10^{14} microrganismi, superando di circa dieci volte il numero totale delle cellule dell'organismo ospite (Honneffer et al., 2014). Questa comunità include non solo batteri, ma anche archaea, virus, funghi e protozoi, configurandosi come un sistema biologico altamente diversificato e funzionalmente rilevante (Pilla & Suchodolski, 2021).

È fondamentale distinguere tra i termini microbiota e microbioma. Il microbiota si riferisce all'insieme di microrganismi che colonizzano un determinato ambiente, come il tratto intestinale. Il microbioma, invece, include anche il patrimonio genetico di tali microrganismi, le molecole da essi prodotte, l'ambiente in cui interagiscono e le relazioni dinamiche con l'ospite (Turnbaugh et al., 2007; Di Lalla, 2021). Le tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) hanno rivoluzionato lo studio del microbioma canino, consentendo di analizzare in modo molto più accurato e profondo la composizione e la funzionalità delle comunità microbiche intestinali (Di Lalla, 2021). Tra i diversi microbiomi del corpo (come quelli cutaneo, orale o genitale), quello intestinale è il più studiato per il suo impatto sulla salute generale (Di Lalla, 2021). Oggi il microbioma intestinale è considerato un vero e proprio organo funzionale, per via delle sue peculiari capacità metaboliche (Gibson & Roberfroid, 1995; Possemiers et al., 2011).

Numerose evidenze scientifiche suggeriscono che il microbioma inizi a svilupparsi già in epoca prenatale (Stinson et al., 2019), influenzando fin dalle prime fasi della vita molteplici aspetti: fisiologia, comportamento, riproduzione e adattabilità dell'ospite (Bordenstein & Theis, 2015; Thomas et al., 2017). In particolare, il microbioma intestinale svolge un ruolo cruciale nella digestione e nel metabolismo, contribuendo alla scomposizione del cibo e alla produzione di metaboliti essenziali, come acidi grassi a catena corta, acidi biliari secondari, vitamine e composti bioattivi (D'Argenio & Salvatore, 2015; Mondo et al., 2019). Questi metaboliti influenzano direttamente il sistema immunitario, regolando la risposta infiammatoria e favorendo l'equilibrio dell'omeostasi intestinale (Tizard & Jones, 2017). Il rapporto tra ospite e microbiota è bidirezionale: l'organismo fornisce un ambiente adatto alla

sopravvivenza dei microrganismi (regolando temperatura, ossigenazione, motilità intestinale), mentre il microbiota contribuisce attivamente alla salute del cane. La barriera epiteliale intestinale rivestita di muco gioca un ruolo fondamentale, rappresentando il punto di contatto tra ospite e microrganismi, e contribuendo alla sorveglianza immunitaria. Sempre più studi indicano che il microbioma intestinale partecipa alla regolazione di numerosi sistemi fisiologici: nervoso, immunitario, endocrino, digestivo, renale e cutaneo (Evenepoel et al., 2017; Tizard & Jones, 2017; Makki et al., 2018). In particolare, i batteri commensali sembrano svolgere un ruolo essenziale nel corretto sviluppo del sistema immunitario, condizionando anche la struttura funzionale dell'intestino (Mondo et al., 2019).

La composizione del microbiota lungo il tratto gastrointestinale non è uniforme, ma varia significativamente in base alle specifiche caratteristiche anatomiche ed ecologiche delle diverse regioni. Numerosi studi hanno evidenziato come ciascun segmento del tratto digerente ospiti comunità microbiche distinte, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo (Alarcón et al., 2017; Proctor & Relman, 2017; Gorkiewicz & Moschen, 2018; Yadav et al., 2018).

Negli ultimi anni, la ricerca condotta sia sull'uomo che sugli animali da compagnia ha riconosciuto l'esistenza di microbiomi specifici in compartimenti come la cavità orale (Dewhirst et al., 2015; Davis, 2016), l'esofago (Corning et al., 2018) e lo stomaco (Bik et al., 2006; Gorkiewicz & Moschen, 2018). Anche all'interno della stessa area anatomica, la composizione microbica è influenzata da fattori locali come pH, concentrazione di ossigeno, presenza di muco e nutrienti (Suchodolski et al., 2008; Wlodarska et al., 2015). Ogni segmento intestinale costituisce quindi un microambiente unico, che favorisce la crescita di comunità specifiche (Pilla & Suchodolski, 2020). Ad esempio, nel cane, il duodeno mostra una maggiore presenza di *Proteobacteria*, mentre nel colon e nel retto prevalgono batteri appartenenti alle famiglie *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* (Suchodolski et al., 2008; Honneffer et al., 2017). Anche il metaboloma cambia lungo il tratto intestinale: nel tenue si riscontrano metaboliti come amminoacidi e piruvato, mentre nel crasso composti di acidi carbossilici contenenti fenoli (Honneffer et al., 2017). Il colon rappresenta la porzione con la maggiore densità e varietà microbica, mentre il tenue, pur meno colonizzato, risulta più sensibile alle variazioni dietetiche. Lungo il tratto intestinale si

osserva un gradiente decrescente di ossigeno, con prevalenza di aerobi nel tenue e anaerobi obbligati nel colon (Yadav et al., 2018).

Per ragioni pratiche e bioetiche, molti studi si basano sull'analisi delle feci, che nei cani riflette abbastanza fedelmente la composizione microbica intestinale, più di quanto avvenga nell'uomo (Vázquez-Baeza et al., 2016). I principali phyla identificati nei cani sani sono *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Actinobacteria*, simili a quelli riscontrati nell'uomo (Swanson et al., 2011). Tuttavia, in presenza di patologie, le alterazioni del microbioma canino mostrano specificità proprie della specie (Vázquez-Baeza et al., 2016). Dal punto di vista metabolico, cani e gatti si distinguono dagli esseri umani per la minore dipendenza dal microbioma intestinale nell'approvvigionamento energetico (Deng & Swanson, 2015). I gatti, in quanto carnivori stretti, necessitano di un elevato apporto proteico, mentre i cani, più onnivori, riescono a digerire anche quantità significative di carboidrati.

La composizione del microbiota intestinale risulta simile nei cani e nei gatti (Hoffmann et al., 2016). I phyla predominanti in entrambe le specie includono *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Actinobacteria* (Deng & Swanson, 2015; Hoffmann et al., 2016). Tuttavia, diversi lavori hanno messo in evidenza alcune differenze specifiche. Un'analisi recente basata su campioni fecali di 46 gatti e 192 cani ha confermato le tendenze già note, rivelando al contempo una maggiore α diversity nei gatti rispetto ai cani. In particolare, nei cani sono risultati più abbondanti i generi batterici *Enterococcus*, *Fusobacterium* e *Megamonas*, mentre nei gatti sono stati rilevati in maggior quantità *Adlercreutzia*, *Alistipes*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Collinsella*, *Coprococcus*, *Desulfovibrio*, *Faecalibacterium*, *Oscillospira*, *Parabacteroides*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Slackia* e *Sutterella* (Jha et al., 2020). Va sottolineato che le proporzioni relative dei diversi phyla possono variare anche tra singoli soggetti della stessa specie, a causa di numerosi fattori come la razza, la dieta, l'età, l'ambiente e le metodologie analitiche utilizzate (Deng & Swanson, 2015; Jha et al., 2020; Pilla & Suchodolski, 2020). Nonostante l'interesse crescente per questi temi, molte pubblicazioni si basano ancora su campioni limitati, evidenziando la necessità di studi su coorti più ampie per chiarire meglio l'influenza delle variabili ambientali e biologiche.

1.6.1 Fattori che influenzano il microbiota del cane

Negli ultimi anni, il microbiota intestinale è stato sempre più riconosciuto come un elemento cruciale per la salute dell'organismo ospite, tanto da essere definito da alcuni autori come un vero e proprio "nuovo organo", fondamentale per la sopravvivenza dell'ospite stesso (Baquero & Nombela, 2012). Questa comunità microbica è estremamente sensibile e può essere influenzata da numerosi fattori, tra cui l'età, la dieta, il sesso e l'ambiente (Tilocca et al., 2017; Hasan & Yang, 2019). Alcuni di questi elementi possono promuovere la stabilità e la diversità del microbiota (eubiosi), mentre altri possono determinare squilibri (disbiosi), favorendo l'insorgenza di disturbi gastrointestinali (Chakraborti, 2015; Tilocca et al., 2017; Nishino et al., 2018; Moffa, et al. 2019; Kim et al. 2021). In particolare, il periodo della crescita rappresenta una finestra critica per la colonizzazione microbica, durante la quale il microbiota risulta particolarmente vulnerabile agli agenti esterni. Alterazioni significative durante questa fase possono avere ripercussioni sulla salute anche in età adulta (Han et al., 2018; Schwarzer et al., 2018). Nel presente paragrafo verranno approfonditi i principali fattori che influenzano il microbiota del cane, con particolare attenzione a tre variabili fondamentali: età, sesso e dieta.

1.6.1.1 Età

L'evoluzione del microbiota intestinale nei mammiferi, con particolare riferimento al cane, è un processo dinamico che si sviluppa lungo l'intero arco della vita. In passato si riteneva che la colonizzazione microbica iniziasse esclusivamente al momento della nascita; tuttavia, studi più recenti hanno messo in discussione questa visione, suggerendo la possibile presenza di comunità microbiche già in ambiente intrauterino. In alcune ricerche condotte su gravidanze a termine, nell'uomo e nel ratto, sono state infatti rilevate comunità batteriche nella placenta, contrariamente all'ipotesi classica di un ambiente sterile (Aagaard et al., 2014; Pérez-Muñoz et al., 2017; Mancino et al., 2019). Nonostante ciò, l'idea di una colonizzazione prenatale rimane ancora oggetto di dibattito (Jiménez et al., 2008; Walker et al., 2017; Kuperman et al., 2019; Rackaityte et al., 2020; Alessandri et al., 2020).

Nel cane, la composizione del microbiota intestinale varia significativamente tra individui e mostra cambiamenti marcati in base all'età. Già a due giorni di vita, il microbiota fecale è dominato da *Firmicutes* (29–95%), seguiti da *Proteobacteria* e

Fusobacteria (Roswall et al., 2021). Intorno ai due mesi, si osserva un aumento della diversità microbica, con una predominanza di *Bacteroidetes*, seguiti da *Firmicutes*, *Fusobacteria* e *Proteobacteria*. Nei cani adulti e anziani è invece stata riscontrata una riduzione significativa del genere *Bifidobacterium* rispetto ai cuccioli (Alessandri et al., 2019a).

Gli studi sul microbiota umano indicano che la maturazione verso una composizione adulta avviene intorno ai tre anni di età, anche se ricerche più recenti suggeriscono tempi più lunghi (Derrien et al., 2019; Mancabelli et al., 2020). Fattori come la modalità del parto e il tipo di alimentazione influenzano il microbiota sia nei neonati umani sia nei cuccioli di cane. Nei neonati umani fino a sei mesi, il microbiota è caratterizzato da bassa diversità con predominanza di *Actinobacteria* (soprattutto *Bifidobacterium*) e *Proteobacteria*, mentre nei cuccioli di cane la composizione risulta differente, con una maggiore presenza di *Firmicutes*. (Vasapolli et al., 2019).

Modalità del parto e alimentazione influenzano profondamente il profilo microbico anche nei cani. Il parto vaginale favorisce la colonizzazione da parte di batteri materni come *Lactobacillus* e *Prevotella*, mentre il parto cesareo determina una predominanza di batteri cutanei, come *Staphylococcus* e *Corynebacterium* (Jiménez et al., 2008). Nei cuccioli, il latte materno rappresenta una fonte significativa di batteri benefici, tra cui *Lactobacillus* (Alessandri et al., 2020), e lo svezzamento contribuisce a un aumento della biodiversità intestinale (Bäckhed et al., 2015; Guard et al., 2017).

Infine, durante la vita adulta, eventi fisiologici come la pubertà e la senescenza influenzano la composizione del microbiota. I cambiamenti ormonali legati alla maturazione sessuale possono modificarne la struttura, mentre nella vecchiaia si osserva una riduzione della biodiversità microbica, con un aumento di specie aerotolleranti e una diminuzione di quelle anaerobiche. Nei cani anziani, è stata documentata una significativa riduzione delle *Fusobacteria* (Alessandri et al., 2020; Kubinyi et al., 2020).

In sintesi, l'età rappresenta un fattore cruciale nel modellare il microbiota intestinale del cane, con dinamiche che presentano analogie interessanti rispetto a quanto osservato nell'uomo.

1.6.1.2 Sesso

Le conoscenze attuali sull'influenza del sesso nella modulazione del microbiota intestinale del cane sono ancora limitate. Alcuni studi, come quello di Coelho et al. (2018), non hanno rilevato differenze significative nella composizione del microbiota tra maschi e femmine, suggerendo che il sesso, in certi contesti, non costituisca un fattore discriminante rilevante. Tuttavia, ricerche più recenti, come quella condotta da Scarsella et al. (2020), hanno offerto un quadro più articolato. In particolare, è emerso che le differenze più marcate non si riscontrano semplicemente tra maschi e femmine interi, bensì tra soggetti interi e sterilizzati (femmine sterilizzate e maschi castrati). I cani interi di sesso opposto risultavano infatti microbiologicamente più simili tra loro rispetto ai rispettivi individui sterilizzati (Figura 4).

Tali osservazioni trovano conferma anche in altri modelli animali. Ad esempio, nei topi è stato osservato che, dopo la pubertà, si verifica una divergenza nella composizione del microbiota intestinale tra maschi e femmine, associata anche a una diversa incidenza di patologie autoimmuni, come il diabete di tipo 1 (Markle et al., 2013; Bolnick et al., 2014). Questo fenomeno suggerisce che la maturazione sessuale rappresenti un momento chiave nella modulazione della comunità microbica.

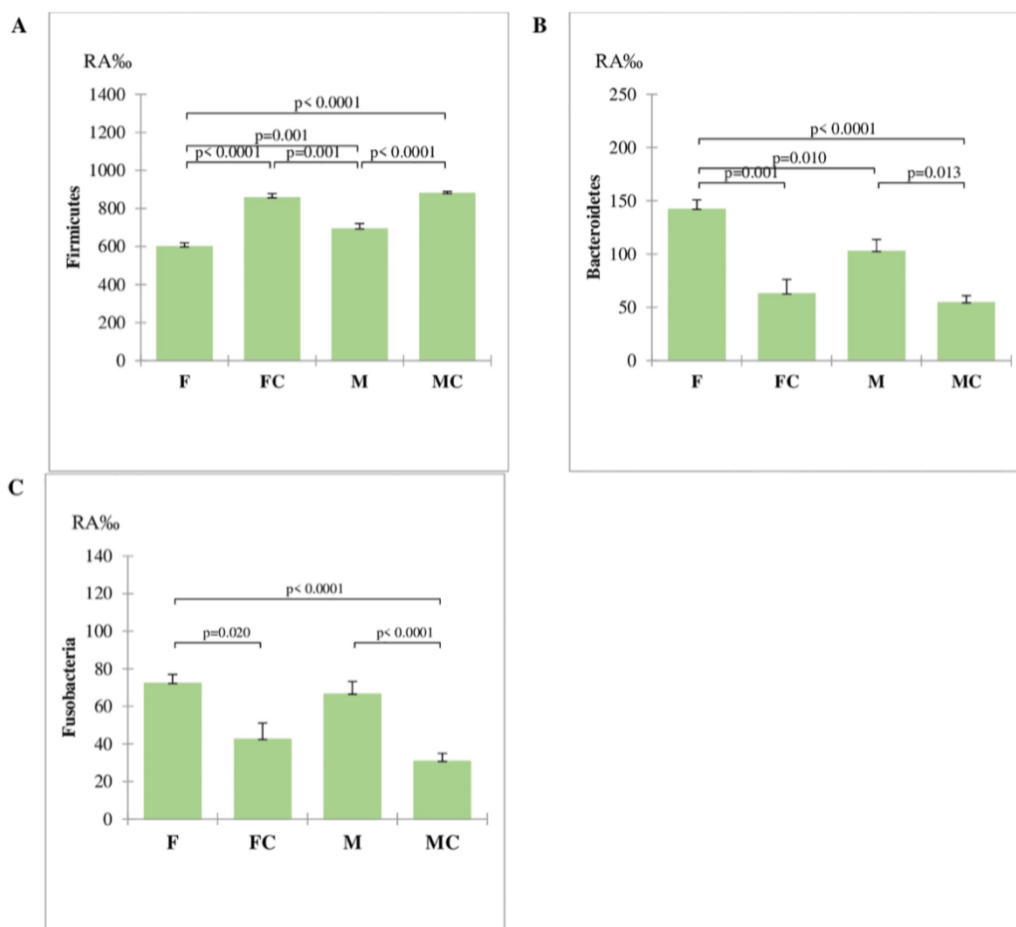


Figura 4 – Differenze nel microbiota intestinale tra cani femmine intere (F), maschi interi (M), femmine sterilizzate (FC), maschi castrati (MC) (Scarsella et al., 2020).

Il meccanismo alla base di questa influenza, sebbene ancora non completamente chiarito, sembra coinvolgere una complessa interazione bidirezionale tra il microbiota e lo stato ormonale dell'ospite (Markle et al., 2013). In particolare, è stato dimostrato che la castrazione nei maschi può invertire la divergenza tra il microbiota di maschi e femmine, indicando un ruolo centrale degli ormoni sessuali nella modulazione della flora intestinale.

In conclusione, sebbene la relazione tra sesso e microbiota intestinale nel cane richieda ulteriori approfondimenti, i dati attuali supportano l'esistenza di una connessione tra assetto ormonale, maturazione sessuale e composizione microbica intestinale. Queste evidenze, in linea con quanto osservato anche nell'uomo e in altri

modelli animali, aprono nuove prospettive per comprendere meglio le dinamiche tra endocrinologia e microbiologia intestinale nel cane.

1.6.1.3 Dieta

La dieta è riconosciuta come uno dei principali fattori in grado di influenzare profondamente la composizione e le funzioni del microbiota intestinale nei mammiferi, inclusi cani e gatti (Ley et al., 2008; David et al., 2014). In questi animali, le abitudini alimentari svolgono un ruolo cruciale nel modulare la biodiversità e l'equilibrio funzionale della flora intestinale (Alessandri et al., 2020). Gli alimenti introdotti con la dieta non solo forniscono energia all'organismo ospite, ma comprendono anche componenti non digeribili che possono fungere da substrati metabolici per i microrganismi intestinali.

Tra i fattori dietetici più rilevanti figurano la consistenza fisica degli alimenti (mangimi estrusi, alimenti umidi, dieta casalinga o dieta BARF), la loro digeribilità complessiva, il bilanciamento tra i macronutrienti, la qualità delle proteine (in termini di composizione amminoacidica e digeribilità), nonché le proprietà dei carboidrati complessi, in particolare delle fibre alimentari non digeribili, che risultano determinanti per il mantenimento dell'equilibrio ecologico del microbiota intestinale (Sandri & Meineri, 2021).

La digeribilità degli alimenti, intesa come la capacità degli stessi di essere scomposti e assorbiti nell'intestino tenue, riveste un ruolo centrale non solo nel regolare l'assorbimento dei nutrienti da parte dell'ospite, ma anche nel determinare la quantità di materiale che raggiunge il colon come substrato metabolico (Sandri & Meineri, 2021; Wernimont et al., 2020). I nutrienti non completamente digeriti diventano disponibili per il metabolismo della comunità microbica intestinale, che li trasforma in molecole più semplici (zuccheri, aminoacidi, acidi grassi) e li fermenta nel cieco e nel colon, generando metaboliti secondari come i postbiotici (Wernimont et al., 2020). L'ospite e il suo microbiota cooperano attraverso l'azione sinergica di enzimi digestivi complementari, che permettono la degradazione degli alimenti mediante processi di saccarolisi, proteolisi e lipolisi, contribuendo al nutrimento sia dell'animale che dei microrganismi residenti (Wernimont et al., 2020).

Diversi studi hanno evidenziato il dinamismo del microbiota intestinale, capace di modificarsi in tempi brevi in risposta a variazioni dietetiche (David et al., 2014;

Mori et al., 2019). Ad esempio, Mori et al. (2019) hanno osservato che una dieta povera in grassi ma ricca in proteine è associata a una riduzione del phylum *Bacteroidetes* e a un aumento dei *Fusobacteria*. Algya et al. (2018) hanno riportato che una dieta a base di pollo crudo e patate dolci determina un incremento sia dei *Bacteroidetes* che dei *Fusobacteria*, accompagnato da una riduzione dei *Firmicutes*, rispetto a una dieta commerciale a base di crocchette. Queste discrepanze suggeriscono che la risposta del microbiota dipenda non solo dalla composizione della dieta, ma anche da fattori individuali, ambientali e probabilmente genetici. A livelli tassonomici più specifici, Algya e collaboratori (2018) hanno segnalato un aumento del genere *Clostridium* nei cani alimentati con una dieta commerciale estrusa rispetto a quelli che ricevevano una dieta a base di carne cruda o cibo umido, mentre Bermingham et al. (2017) hanno riscontrato una riduzione dello stesso genere nei soggetti nutriti con dieta estrusa. Altri generi batterici come *Lactobacillus*, *Dorea*, *Prevotella*, *Turicibacter*, *Ruminococcus* e *Megamonas* risultavano più abbondanti nei cani che seguivano una dieta estrusa. Studi successivi (Herstad et al., 2017; Kim et al., 2017) hanno confermato variazioni nella composizione del microbiota intestinale in relazione al tipo di dieta. In particolare, le diete ricche in fibre (ad esempio con polpa di barbabietola) aumentano l'abbondanza di *Lactobacillus* spp., *Faecalibacterium* e *Clostridium*, e riducono *Fusobacteria*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* (Middelbos et al., 2010; Swanson et al., 2011; Maria et al., 2017). Viceversa, le diete crude o ricche in carne favoriscono *Lactobacillus*, *Enterobacteria*, *Fusobacteria*, *Clostridiaceae*, ma riducono *Prevotella* e *Faecalibacterium* (Sandri et al., 2016; Bermingham et al., 2017; Schmidt et al., 2018).

È interessante notare che, nei cani adulti, tali alterazioni microbiche sembrano reversibili, come dimostrato da studi in cui la composizione del microbiota tornava allo stato iniziale dopo il ripristino della dieta originaria (Herstad et al., 2017).

Alcuni studi suggeriscono che la presenza o abbondanza di specifici taxa possa rappresentare un indicatore di disbiosi, ma non è sufficiente da sola a definire lo stato di salute intestinale. È infatti necessaria una valutazione complessiva che consideri molteplici, se non tutti, i gruppi microbici presenti (AlShawaqfeh et al., 2017). Vázquez-Baeza et al. (2016) hanno evidenziato che la diversità e la struttura generale della comunità microbica, più che la variazione di singoli taxa, possono costituire una firma distintiva del microbiota fecale utile a distinguere i cani affetti da malattia

infiammatoria intestinale da quelli sani (Vázquez-Baeza et al., 2016; AlShawaqfeh et al., 2017).

Le modificazioni nella dieta influenzano anche il metaboloma, ovvero l'insieme dei metaboliti prodotti. Ad esempio, un incremento dell'apporto proteico può essere associato a una maggiore presenza di *Fusobacteria*, mentre diete dimagranti hanno mostrato un aumento di *Bacteroidetes*, *Prevotella* e *Faecalibacterium*, questi ultimi noti per la produzione di SCFA. Allo stesso modo, l'introduzione di una dieta a basso contenuto lipidico è stata collegata a un incremento di *Faecalibacterium* (Pilla & Suchodolski, 2021). Un apporto eccessivo di proteine, soprattutto di bassa qualità e scarsa digeribilità, può favorire la proliferazione di batteri come *Clostridium perfringens* (Hankel et al., 2020). Al contrario, diete ricche in fibre e carboidrati sono associate a una maggiore diversità microbica, prevalenza di *Bacteroidetes* e ridotta presenza di *Fusobacteria* e *Actinobacteria* (Alessandri et al., 2019b). L'aggiunta di ingredienti freschi, in particolare di origine animale, a diete commerciali sembra incrementare la diversità microbica e modificare i profili postbiotici (Kim et al., 2017; Sandri et al., 2016; Scarsella et al., 2020; Sandri & Meineri, 2021).

Tra le diete più discusse, la BARF (Bones And Raw Food), ricca in proteine e grassi e povera in carboidrati e fibre, influenza significativamente il microbiota: nei cani che la seguono si è osservata una riduzione di *Firmicutes* e *Bacteroidetes* e un aumento di *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e batteri proteofili. Tali variazioni sembrano correlate più al bilanciamento dei macronutrienti che alla fonte di carne utilizzata (Sandri & Meineri, 2021). Anche le diete ipoallergeniche, pur non modificando significativamente il microbiota in cani sani, possono migliorarne la composizione in soggetti con disturbi gastrointestinali come la diarrea di origine alimentare (Pilla & Suchodolski, 2021). Altre strategie includono l'integrazione con prebiotici, capaci di stimolare i microrganismi benefici e la produzione di SCFA.

Infine, la durata del regime alimentare sembra giocare un ruolo fondamentale. Le modificazioni nel microbiota sono più stabili quando i cambiamenti nei macronutrienti sono prolungati nel tempo. In uno studio su Labrador Retriever alimentati per 32 settimane con una dieta a base di amminoacidi purificati e amido facilmente digeribile, la flora intestinale è tornata rapidamente alla composizione iniziale una volta reintrodotta la dieta standard (Allaway et al., 2020).

1.7 FONTI PROTEICHE ALTERNATIVE NELL'ALIMENTAZIONE DEI PET: I SOTTOPRODOTTI DELLA FILIERA AVICOLA

Dopo aver analizzato i principali fattori che influenzano la digeribilità delle fonti proteiche nell'alimentazione degli animali da compagnia, emergono con chiarezza gli aspetti più rilevanti nella ricerca di fonti alternative e sostenibili per la produzione di pet food, sempre più necessarie nel contesto dell'attuale scenario economico globale.

Infatti, il costante aumento della popolazione ha determinato un incremento significativo nel consumo di carne avicola, comportando contestualmente una grande produzione di scarti derivanti dal pollame (Jagadeesan et al., 2024). Un esempio concreto di economia circolare e valorizzazione dei sottoprodotti si riscontra proprio nella filiera avicola, dove i materiali di scarto vengono sempre più spesso reimpiegati, trasformandosi da rifiuti in risorse utili.

Nel contesto italiano, la filiera avicola coinvolge oltre 15.000 aziende, di cui più di 6.000 a carattere professionale, con circa 38.000 addetti operanti nella fase agricola (comprendente allevamenti, incubatoi, impianti di ingrasso e produzione di mangimi). A questi si aggiungono 1.600 imprese impegnate nella trasformazione (macellazione, sezionamento, lavorazione delle uova), che impiegano oltre 25.000 persone. Complessivamente, nel Paese vengono allevati oltre 158 milioni di capi. Va inoltre sottolineato che il comparto avicolo rappresenta l'unico settore zootecnico italiano autosufficiente, con un tasso di autoapprovvigionamento del 108% nel 2021 (Biguzzi, 2022). L'associazione di riferimento per la tutela del comparto è Unaitalia, che rappresenta più del 92% della produzione di carne avicola, circa il 20% della filiera uova, oltre il 20% della filiera suinicola e circa il 40% di quella cunicola (Biguzzi, 2022).

Mirando alla sostenibilità del settore della nutrizione degli animali da affezione, il settore avicolo ha avviato strategie di valorizzazione di diversi sottoprodotti quali carcasse, visceri, teste, zampe, ossa, piume, sangue e penne, destinandoli all'impiego nel pet food.

Tra questi, le piume di pollo, tra i sottoprodotti più abbondanti ed economici, hanno attirato particolare attenzione: nel solo 2019 ne sono state prodotte circa 5 milioni di tonnellate a livello globale (Qiu et al., 2020; Jagadeesan et al., 2024). Queste

piume possiedono caratteristiche fisiche peculiari, come bassa densità, elevata flessibilità e comprimibilità, capacità di assorbire calore, resistenza alla trazione e proprietà fonoassorbenti, che le rendono competitive rispetto a numerosi materiali fibrosi, sia naturali che sintetici. Oltre al valore fisico, le piume si distinguono per l'alto contenuto proteico e la presenza di importanti minerali (Ca, P, K, Mg), il che le rende una risorsa interessante per l'integrazione nei mangimi animali come fonte proteica o integratore amminoacidico (Jagadeesan et al., 2024). L'utilizzo della farina idrolizzata di piume nell'alimentazione animale è documentato già dalla fine degli anni '80 (Piccioni et al., 1989). La cheratina contenuta nelle piume viene idrolizzata, solitamente in autoclave, per ottenere proteine e aminoacidi assimilabili fino all'80%. Dal punto di vista economico, la farina di piume idrolizzata si presenta come una fonte proteica relativamente economica, con costi inferiori rispetto a quelli di altre farine proteiche di origine animale, come, ad esempio, quella di pesce. Secondo recenti analisi di mercato, il prezzo medio della farina di piume si aggira tra i 350 e i 570 euro per tonnellata, mentre quello della farina di pesce varia tra i 1.000 e i 1.500 euro per tonnellata (Mordor Intelligence, 2023). Questo divario rende la farina di piume una soluzione economicamente interessante per l'industria zootecnica, soprattutto in contesti in cui la disponibilità della materia prima è elevata e i margini economici sono limitati. Questo aspetto, unito alla disponibilità abbondante della materia prima, ne favorisce l'impiego su larga scala nei mangimi. Tuttavia, le piume non possono essere impiegate come unica fonte proteica nell'alimentazione dei monogastrici poiché presentano un profilo amminoacidico incompleto: risultano carenti di lisina, triptofano e metionina, anche se quest'ultima può essere parzialmente compensata dalla presenza di cisteina. Studi condotti sui suini hanno dimostrato che la sostituzione parziale della farina di pesce con farina di piume non compromette significativamente né l'aumento ponderale né l'indice di conversione alimentare (Piccioni et al., 1989). Più recentemente, la ricerca scientifica ha evidenziato ulteriori applicazioni delle piume avicole, utilizzate come idrolizzati proteici con funzione biostimolante o come substrati per la produzione di enzimi e molecole bioattive (Jagadeesan et al., 2024).

In conclusione, la valorizzazione dei sottoprodotti avicoli, e in particolare delle piume di pollo, rappresenta un'opportunità concreta per promuovere un modello produttivo più sostenibile, efficiente e circolare.

1.8 PIUME DI POLLO IDROLIZZATE

Nella produzione avicola, le piume costituiscono un sottoprodotto dei macelli, corrispondente a circa il 7% del peso corporeo dell'animale (Machado et al., 2021). Questi materiali, insieme alle penne, vengono trasformati in farina di piume idrolizzate, una risorsa ricca di cheratina con un contenuto di proteine grezze superiore all'85% sulla sostanza secca. La trasformazione della cheratina avviene tramite idrolisi, un processo che scompone le proteine in frammenti più piccoli, polipeptidi, peptidi e amminoacidi, mediante l'azione di acqua, calore, pressione, enzimi o sostanze chimiche. L'idrolisi rompe parzialmente la struttura delle proteine, macromolecole costituite da lunghe catene di amminoacidi legate da legami peptidici, aumentandone la biodisponibilità e migliorandone la digeribilità (GA Pet Food Partners, 2021).

Le tecniche di idrolisi impiegate sono generalmente di tipo chimico, termico o enzimatico. L'idrolisi chimica, che utilizza acidi o basi, è economicamente vantaggiosa, ma può compromettere la qualità nutrizionale degli idrolizzati: l'idrolisi acida distrugge completamente il triptofano e danneggia altri amminoacidi essenziali, mentre l'idrolisi alcalina degrada la maggior parte degli amminoacidi essenziali, pur preservando il triptofano (Pasupuleti & Braun, 2010; Dai et al., 2014; Hou et al., 2022). L'idrolisi termica, sebbene utile per facilitare la rottura dei legami peptidici, può influire negativamente sulla qualità proteica a causa dell'esposizione ad alte temperature. Questo trattamento può causare denaturazione irreversibile delle proteine, perdita di aminoacidi essenziali e alterazioni delle proprietà funzionali (Plumb et al., 1994; Torreggiani et al., 2008). L'entità di tali effetti dipende in modo significativo dalla durata e dalla temperatura del trattamento applicato. L'idrolisi enzimatica rappresenta un approccio più selettivo: impiega proteasi che operano in condizioni moderate di temperatura e pH, mantenendo un controllo più preciso sulla scissione proteica e preservando meglio il profilo amminoacidico. Inoltre, consente di arrestare la reazione al momento desiderato tramite inattivazione termica degli enzimi (Hou et al., 2022).

Nonostante l'alto contenuto proteico, la digeribilità in vivo della farina di piume idrolizzate è relativamente bassa, con valori complessivi di circa il 67% nei cani (Pacheco et al., 2016). Per migliorarne la qualità nutrizionale, è stato sperimentato

l'impiego di microrganismi proteolitici nella degradazione della cheratina. La fermentazione biologica operata da ceppi selezionati consente una scissione più efficiente, aumentando la disponibilità di amminoacidi, in particolare quelli solforati, e migliorando il valore nutrizionale complessivo (Cedrola, 2012). Il basso peso molecolare delle frazioni solubili ottenute con trattamenti termici favorisce inoltre l'assorbimento intestinale. La combinazione di trattamento termico e azione microbica si è rivelata efficace nell'incrementare la biodisponibilità degli amminoacidi (Pacheco et al., 2016).

Questi ingredienti proteici sono oggetto di crescente interesse nell'ambito della nutrizione degli animali da compagnia, in particolare per la formulazione di diete ipoallergeniche destinate a cani e gatti (Nascente et al., 2006; Harvey & Hall, 2009). Tuttavia, va considerato che, nella loro forma naturale, piume e penne presentano una struttura estremamente compatta e indigeribile per cani e gatti. L'apparato digerente di questi animali non è in grado di degradare efficacemente la cheratina. Ciononostante, attraverso l'idrolisi è possibile rendere le proteine più semplici e accessibili all'assorbimento intestinale, trasformandole in ingredienti nutrizionalmente validi e sicuri (Hand et al., 2010).

Sebbene l'idrolisi proteica riduca in modo significativo la capacità delle proteine di essere riconosciute dal sistema immunitario e quindi la loro potenziale allergenicità, è importante considerare che i trattamenti tecnologici possono anche esporre nuovi epitopi o generare peptidi neoformati che, in alcuni casi, possono mantenere o acquisire una certa immunogenicità. Pertanto, l'efficacia ipoallergenica di questi ingredienti dipende dal grado di idrolisi, dalla modalità di trattamento e dalla sensibilità individuale del soggetto (Hand et al., 2010).

Un ulteriore aspetto riguarda la presenza e l'accumulo di microrganismi benefici nella farina di piume dopo il trattamento, qualora vengano impiegati microrganismi specifici per l'idrolisi. Alcuni ceppi di *Bacillus* spp. sono noti per la loro capacità di degradare le piume e per i potenziali effetti positivi sulla salute dell'ospite dopo somministrazione orale (Ferrareze et al., 2016; Ritter et al., 2018). Le forme sporulate di questi batteri sopravvivono all'ambiente acido dello stomaco e raggiungono l'intestino in elevate quantità, dove possono esercitare un effetto di

esclusione competitiva nei confronti di batteri indesiderati, noto come effetto probiotico (Casula et al., 2002).

Nel pet food, la fonte proteica idrolizzata di origine animale è il pollo (di origine animale) (Pibot et al., 2006). Attualmente, altre componenti del pollo sono impiegate dopo il processo di idrolisi, seppur con minore diffusione, quali le piume e penne. Il loro utilizzo nella mangimistica, dopo adeguati trattamenti di idrolisi, rappresenta una risorsa proteica alternativa e sostenibile nell'alimentazione degli animali domestici.

2. OBIETTIVO DELLA TESI

Questo studio è stato condotto nell'ambito del progetto di Ricerca "Valorizzazione mangimistica di scarti biologici della produzione avicola, di cascame termico industriale e di CO₂", Acronimo **BIO=C=O**, MISE PON "Imprese e Competitività" 2014-2020 – FESR Asse I – Innovazione e Azione, ASSE 6 REACT Priorità di investimento 13. i Azione 1, "Finanziato nell'ambito della risposta dell'Unione alla pandemia di COVID-19". Fondo crescita Fabbrica Intelligente, Agrifood e Scienze della vita – Procedura a sportello D.D. 20 novembre 2018.

Il progetto BIO=C=O è finalizzato alla valorizzazione mangimistica di alcuni scarti biologici provenienti da produzioni avicole, da cascami termici industriali e da anidride carbonica. L'obiettivo è reintegrare, all'interno di un processo produttivo ad alto valore economico, risorse ed energia che altrimenti andrebbero disperse.

Nel dettaglio, l'Università degli Studi di Messina ha orientato la propria ricerca verso lo sviluppo di nuove tipologie di mangimi, il cui valore non risiede esclusivamente nel prezzo di mercato, ma anche nella capacità di trasformare sottoprodotti in risorse utili. In quest'ottica, uno dei focus è la sostituzione della farina di pollo nei pet food, mediante l'utilizzo di proteine alternative provenienti da processi di economia circolare della filiera avicola. In particolare, è stata valutata la sostituzione parziale della farina di pollo con farina di piume idrolizzata, un sottoprodotto derivante dalla lavorazione degli avicoli. Questa linea di ricerca è stata sviluppata in collaborazione con il gruppo Leocata Mangimi, azienda leader in Sicilia nella filiera del pollo da carne e nella produzione di mangimi zootecnici, nonché capofila del progetto BIO=C=O (Figura 5).

La presente tesi si inserisce nell'ambito della Prestazione 4 del progetto BIO=C=O, dedicata allo sviluppo di mangimi innovativi per animali da compagnia. L'obiettivo principale è l'elaborazione di nuove formulazioni che includano sottoprodotti derivanti dalla filiera avicola. Questo approccio rappresenta un'innovazione di prodotto, mirata all'ottimizzazione di mangimi già esistenti nella linea produttiva di Leocata Mangimi. L'introduzione di queste nuove miscele consente inoltre di valorizzare eventuali eccedenze di scarti avicoli, contribuendo a una gestione più efficiente e sostenibile delle risorse.

La tesi si è posta come obiettivo la valorizzazione degli scarti provenienti dalla filiera agroalimentare per la formulazione di mangimi destinati agli animali da compagnia. Questa strategia risponde all'esigenza di individuare ingredienti alternativi che siano al contempo salubri, economicamente sostenibili e compatibili con i criteri di sostenibilità ambientale. Il lavoro si inserisce nel contesto delle attività di ricerca dell'Unità di Produzione Animale dell'Università di Messina, da sempre attiva nella ricerca e sviluppo di soluzioni innovative ad alto valore aggiunto per il settore zootecnico e mangimistico.

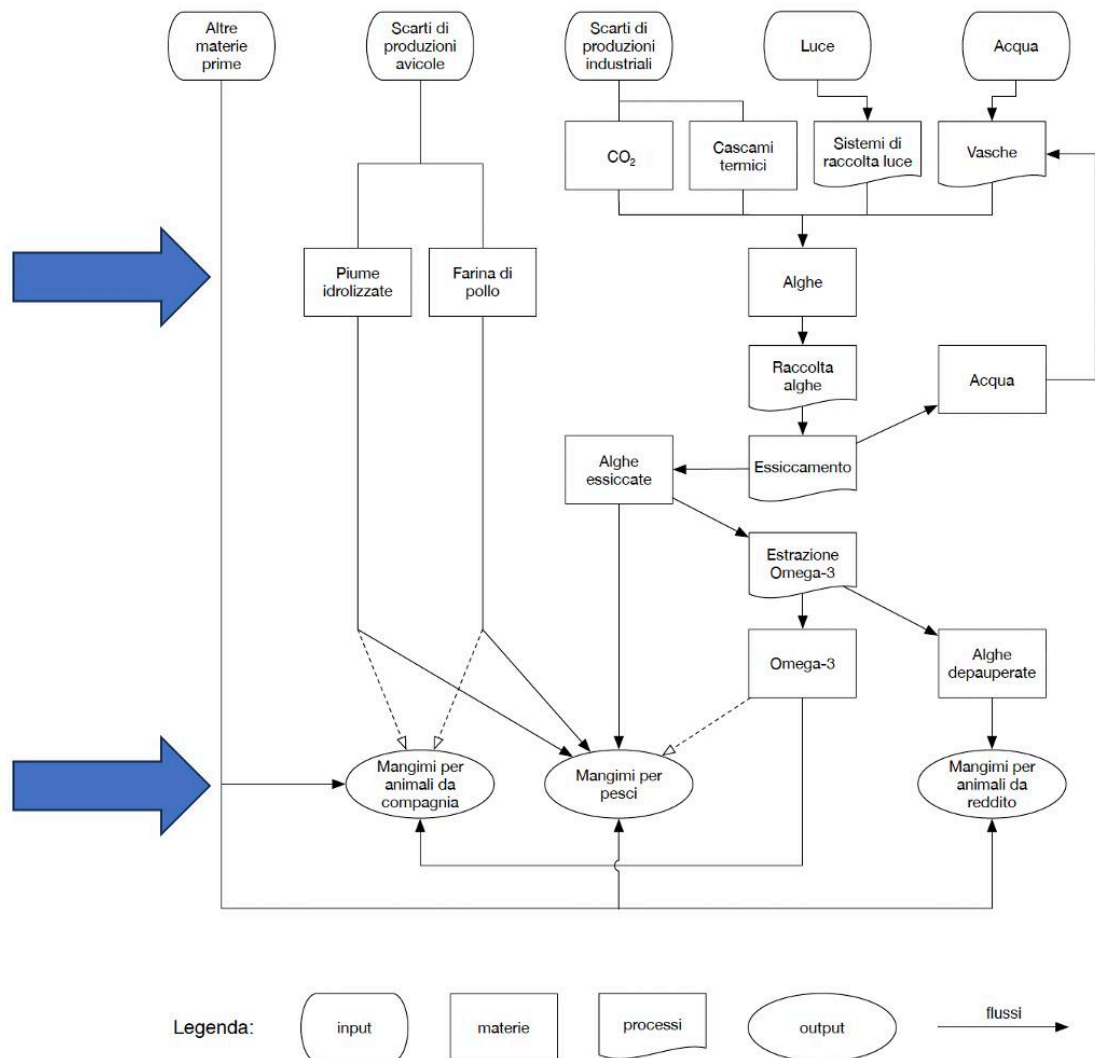


Figura 5 – Logica del Progetto BIO=C=O.

Attraverso l'analisi delle performance zootecniche, del microbiota intestinale, della digeribilità dei nutrienti e dei metaboliti derivanti dalla fermentazione proteica, la tesi si propone di valutare le potenzialità di una fonte proteica alternativa nell'alimentazione di cani adulti. L'obiettivo di questo lavoro è contribuire allo sviluppo di nuove formulazioni di mangimi, nutrizionalmente bilanciate e meno dipendenti da materie prime convenzionali, promuovendo soluzioni più sostenibili dal punto di vista ambientale e valutandone l'efficacia e l'adattabilità nell'alimentazione di cani adulti.

3. MATERIALI E METODI

La sperimentazione ha ottenuto l'approvazione dal Comitato Etico del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Messina il 24 gennaio 2023, con codice 01/2023, e la prova è stata condotta in conformità alle linee guida della Direttiva Europea 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici e del Regolamento (CE) n. 767/2009 relativo all'immissione sul mercato e all'uso dei mangimi.

3.1 DIETE SPERIMENTALI

Per le prove sono state formulate due diete sperimentali isoenergetiche, isoproteiche e isolipidiche. La dieta controllo (PM) conteneva il 16% di farina di pollo come principale fonte proteica, mentre la dieta trattata (HFM) prevedeva l'inclusione del 7% di farina di piume idrolizzate (GOLDMEHL FM, Gepro, Diepholz, Germania) come sostituto parziale della farina di pollo. GOLDMEHL FM è ottenuto da sottoprodotti avicoli sani, ed è classificato come proteina animale trasformata di Categoria III, in conformità al Regolamento (CE) n. 1069/2009.

I mangimi utilizzati nelle due prove sono stati prodotti da un'azienda mangimistica italiana, utilizzando una formulazione sviluppata in collaborazione con l'Unità di Produzione Animale del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Messina. I mangimi sperimentali sono stati preparati mediante pellettatura, utilizzando come fonte di amido cereali pregelatinizzati, caratterizzati da un'elevata digeribilità dell'amido (95%). Entrambe le diete sperimentali contenevano acido docosaesaenoico (DHA) di origine algale, derivato principalmente da *Schizochytrium* spp.. Inoltre, entrambe le diete sperimentali contenevano gli stessi ingredienti, additivi nutrizionali e antiossidanti.

Ingredienti: cereali pre-gelatinizzati: riso 30% (digeribilità dell'amido 95%), cereali maltati 0,3%, proteine animali processate di origine avicola 16%, oli e grassi – (Omega 3 DHA da alghe 0,18%, trigliceridi a catena media 0,2%), verdure (cicoria-FOS, pisello, fibra d'aglio), estratto di carruba (tostato), pesce e sottoprodotti ittici, semi di lino estrusi, minerali, lieviti: *Saccharomyces cerevisiae*, pareti cellulari – M.O.S. (mannano-oligosaccaridi), alghe, *Yucca schidigera*; estratti di *Andrographis paniculata*, *Boerhavia diffusa*, *Physalis amarus*, *Solanum nigrum*, *silimarina*.

Additivi come riportato in etichetta (mg/kg): vitamine: 3a672a – Vit. A UI 20.000, 3a67 – Vit. D3 UI 1.600, 3a700 – Vit. E mg 240, 3a821 – Vit. B1 (tiamina monoidrato) mg 12,50, 3a825ii – Vit. B2 (riboflavina) mg 25, 3a831 – Vit. B6 (piridossina cloridrato) mg 7,50, Vit. B12 (cianocobalamina) mg 0,009, 3a711 – Vit. K3 MNB mg 4, 3a312 – Vit. C protetta mg 125, 3a314 – Niacina mg 68,50, 3a880 – Vit. H (biotina) mg 1, 3a841 – Acido pantotenico mg 35,50, 3a316 – Acido folico mg 1,80, 3a890 – Cloruro di colina mg 1500, 3a160a – Beta-carotene mg 10, 3a910 – L-Carnitina mg 100. Minerali: 3b101 – Ferro (carbonato ferroso) mg 50,50 + 3b103 – Ferro (solfato ferroso monoidrato) mg 50,50 + 3b105 – Ferro (fumarato ferroso) mg 35,00 + 3b107 – Ferro (chelato di glicina) mg 46,00, 3b502 – Manganese (ossido manganoso) mg 76,00 + 3b510 – Manganese (chelato dell’analogo idrossilato della metionina) mg 30,25, 3b605 – Zinco (solfato di zinco monoidrato) mg 127,00 + 3b610 – Zinco (chelato dell’analogo idrossilato della metionina) mg 37,50, 3b405 – Rame (solfato rameico pentaidrato) mg 10,00 + 3b410 – Rame (chelato dell’analogo idrossilato della metionina) mg 2,20, 3b203 – Iodio (iodato di calcio anidro) mg 2,50, 3b802 – Selenio (selenito di sodio) mg 0,13 + 3b810 – Selenio organico *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3060 mg 0,002. Aminoacidi: 3c301 – DL Metionina mg 440, 3c322 – Lisina cloridrato mg 130,00, 3c307 – Analogo idrossilato della metionina mg 330. Conservanti: 1a300 – Acido citrico mg 200, E332 – Citrato di potassio mg 500; Regolatori di acidità: 4d8 – Cloruro di ammonio mg 800.

Antiossidanti: 1b3068(i) – Estratti naturali ricchi di tocoferolo mg 320, 3a300 – Acido L-ascorbico mg 255. Additivo organolettico: estratto di castagno mg 2800.

I sacchi di mangime delle due diete sperimentali sono stati trasportati in allevamento dove sono stati conservati per tutta la durata della prova in ambiente asciutto e lontano dall’esposizione dei raggi solari. Al contempo, campioni dei mangimi sperimentali e della farina di piume idrolizzate, sono stati trasportati nel laboratorio dell’Unità di Produzione Animale del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell’Università degli Studi di Messina dove, dopo aver verificato il peso e la conformità dei materiali ricevuti, i campioni sono stati debitamente analizzati. In Figura 6 sono mostrati i campioni di diete e farina di piume idrolizzate appena giunti nei locali dell’Unità di Produzione Animale.



Figura 6 – Mangime PM (farina di pollo 16%), mangime HFM (farina di pollo 16%, farina di piume idrolizzate 7%), farina di piume idrolizzate.

3.1.1 Analisi Chimiche delle diete sperimentali e della farina di piume idrolizzate

Le analisi chimiche dei campioni sperimentali sono state effettuate in collaborazione con l'Unità di Chimica degli Alimenti del Dipartimento di Scienze biomediche, odontoiatriche e delle immagini morfologiche e funzionali. Prima delle analisi i mangimi sono stati macinati in un mulino a taglio, dotato di setaccio da 1 mm (Cyclotec 1093 Sample mill, FOSS Hillerød, Danimarca). La composizione chimica della farina di piume idrolizzate e delle diete sperimentali (PM e HFM) è stata analizzata in triplicato, seguendo le procedure stabilite dall'AOAC (2010). Sono stati adottati i seguenti metodi: metodo 934.01 per la determinazione della sostanza secca (s.s); metodo 942.05 per il contenuto di ceneri; metodo 990.03 per le proteine grezze (PG); metodo 954.02 per i grassi idrolizzati con acido; metodo 978.10 per la fibra grezza (FG). Il contenuto totale di amido è stato determinato mediante un kit Megazyme Total Starch Assay (Megazyme©, NEOGEN, Lansing, Michigan, USA) seguendo il metodo 996.11 (AOAC, 2019). La fibra alimentare solubile (SDF) e insolubile (IDF) è stata analizzata utilizzando il kit *Total Dietary Fiber Assay* (Megazyme, NEOGEN, Lansing, MI, USA), secondo il metodo 991.43 (AOAC, 2019). I risultati sono stati espressi in g/100 g sul t.q..

Sulla base dei risultati ottenuti, è stata calcolata l'energia metabolizzabile (ME) della farina di piume idrolizzate e delle due diete sperimentali (PM e HFM) utilizzando

l'equazione predittiva con i fattori di Atwater modificati per cani e gatti (3,5 kcal/g proteine, 8,5 kcal/g grassi e 3,5 kcal/g NFE), come descritto da AAFCO (2019).

- *Calcolo densità di energia metabolizzabile (DEM) della farina di piume idrolizzate:*

$$\text{DEM (Kcal/100g)} = (3,5 \times \text{g proteine}) + (8,5 \times \text{g grassi}) + (3,5 \times \text{g NFE})$$

Il calcolo degli estrattivi inazotati è pari a:

$$\text{NFE} = 100 - (\text{Umidità} + \text{proteine} + \text{grassi} + \text{fibre} + \text{Ceneri}):$$

Nel caso della dieta PM:

$$\text{NFE} = 100 - (5,59 + 82,64 + 7,07 + 0,91 + 1,83) = 1,96\%/tq$$

Quindi:

$$\text{DEM (kcal/100g)} = (82,64 \times 3,5) + (7,07 \times 8,5) + (1,96 \times 3,5) = 354,78 \text{ kcal/100g}$$

- *Calcolo densità di energia metabolizzabile (DEM) dieta PM:*

$$\text{DEM (Kcal/100g)} = (3,5 \times \text{g proteine}) + (8,5 \times \text{g grassi}) + (3,5 \times \text{g NFE})$$

Il calcolo degli estrattivi inazotati è pari a:

$$\text{NFE} = 100 - (\text{Umidità} + \text{proteine} + \text{grassi} + \text{fibre} + \text{Ceneri}):$$

Nel caso della dieta PM:

$$\text{NFE} = 100 - (9,16 + 19,07 + 15,24 + 2,10 + 5,45) = 48,98\%/tq$$

Quindi:

$$\text{DEM (kcal/100g)} = (19,07 \times 3,5) + (15,24 \times 8,5) + (48,98 \times 3,5) = 367,72 \text{ kcal/100g}$$

- *Calcolo densità di energia metabolizzabile (DEM) dieta HFM:*

$$\text{DEM (Kcal/100g)} = (3,5 \times \text{g proteine}) + (8,5 \times \text{g grassi}) + (3,5 \times \text{g NFE})$$

Il calcolo degli estrattivi inazotati è pari a:

$$\text{NFE} = 100 - (\text{Umidità} + \text{proteine} + \text{grassi} + \text{fibre} + \text{Ceneri}):$$

Nel caso della dieta HFM:

$$\text{NFE} = 100 - (8,08 + 19,20 + 15,00 + 2,00 + 5,01) = 50,71\%/tq$$

Quindi:

$$\text{DEM (kcal/100g)} = (19,20 \times 3,5) + (15,0 \times 8,5) + (50,71 \times 3,5) = 372,19 \text{ kcal/100g}$$

La composizione chimica e il contenuto di energia metabolizzabile (ME) della farina di piume idrolizzate e delle diete sperimentali (PM e HFM) sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1 - Valori medi della composizione chimica (g/100g, t.q.) e dell'energia metabolizzabile (ME) delle diete sperimentali.

	Farina di piume idrolizzate	Diete	
		PM ¹	HFM ¹
SS	94,41	90,84	91,92
UM	5,59	9,16	8,08
PG	82,64	19,07	19,20
Grassi	7,07	15,24	15,00
FG	0,91	2,10	2,00
CN	1,83	5,45	5,01
Amido	5,63	40,59	40,80
NFE	1,96	48,98	50,71
OM	92,63	85,39	86,91
TDF	2,38	7,51	6,97
IDF	2,03	6,14	5,98
SDF	0,35	1,37	1,00
ME, Kcal/100g (t.q.)	355	368	372

¹ Dieta PM: dieta con farina di pollo (16%).

² Dieta HFM: dieta con farina di pollo (9%) e farina di piume idrolizzate (7%).

SS: sostanza secca, UM: umidità, PG: proteine grezze, FG: fibre grezze, CN: ceneri, NFE: estrattivi inazotati, OM: sostanza organica, TDF: Fibra dietetica totale, IDF: fibra dietetica solubile, SDF: fibra dietetica insolubile, ME: energia metabolizzabile.

La composizione amminoacidica delle due diete è stata analizzata secondo il metodo descritto da Oteri et al. (2021), utilizzando un cromatografo Trace 1310 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) dotato di rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) e colonna ZB-AAA Amino Acid (10 m × 0,25 mm di diametro interno). La temperatura del forno è stata programmata da 110 a 320 °C con un incremento di 32 °C/min, seguito da una isoterma finale di 320 °C per 1 minuto. Durante l'idrolisi acida, l'asparagina e la glutammina sono state convertite rispettivamente in acido aspartico e

acido glutammico; pertanto, i valori riportati corrispondono alla somma di asparagina + acido aspartico e glutammina + acido glutammico. L'analisi è stata eseguita in triplicato per entrambe le diete e i risultati sono stati espressi in g/100 g sul t.q..

Le concentrazioni delle ammine biogene presenti nelle diete sperimentali sono state analizzate secondo il metodo descritto da Chiofalo et al. (2019), utilizzando un sistema HPLC (Shimadzu Italia, Milano, Italia) accoppiato a un rivelatore a fluorescenza RF-20A (FLD, Shimadzu Italia, Milano, Italia), con lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione rispettivamente pari a 320 nm e 523 nm (Preti et al., 2015). Lo strumento era equipaggiato con una colonna SUPELCOSIL LC-18 (25 cm × 4,6 mm, 5 µm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) e con un forno termostato (CTO-20A, Shimadzu Italia, Milano, Italia) mantenuto a 35°C. È stata impiegata un'eluzione a gradiente con acqua per HPLC e acetonitrile, a un flusso costante di 0,8 mL/min, utilizzando un degasatore DGU-20A5R e una pompa LC-20AD (entrambi Shimadzu Italia, Milano, Italia). Il tempo totale di analisi è stato di 35 minuti. L'identificazione e la quantificazione delle ammine biogene sono state effettuate mediante calibrazione esterna, utilizzando standard commerciali (Merck, Darmstadt, Germania). Le soluzioni standard iniziali sono state preparate in acido perclorico a una concentrazione di 1 mg/mL per ciascuna ammina, e successivamente diluite a concentrazioni di 0,0005, 0,001, 0,005, 0,010, 0,025 e 0,050 mg/mL per la costruzione delle curve di calibrazione. Il limite di quantificazione (LOQ) nella soluzione standard è risultato pari a 0,001 mg/g per tutte le ammine. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato e i risultati sono stati espressi in mg/g sul t.q..

3.2 GLI ANIMALI

Durante le prove sperimentali (Trial 1 e Trial 2), i cani sono stati tenuti in box con esposizione al naturale ciclo luce-buio (ritmo circadiano naturale, dall'alba al tramonto). L'attività fisica veniva svolta due volte al giorno (mattina e sera) per circa 30 minuti ciascuna, in uno spazio esterno. Tutti i soggetti avevano regolari opportunità di socializzare, sia tra loro che con i membri della famiglia dei proprietari.

Tutti i soggetti coinvolti nelle due prove, prima di essere reclutati e prima della somministrazione delle diete sperimentali, sono stati sottoposti ad una serie di esami e valutazioni cliniche, al fine di escludere la presenza di patologie o parassitosi che potessero compromettere lo stato di salute e influenzare gli esiti delle valutazioni.

- *Analisi ematologiche*

Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad analisi ematologiche per i seguenti parametri:

- Emocromo con formula leucocitaria
- Protidogramma Elettroforetico
- Glucosio
- Urea
- Creatinina
- Colesterole totale
- Transaminasi AST (GOT)
- Transaminasi ALT (GPT)
- Gamma-GT
- Bilirubina totale
- Fosfatasi alcalina
- Proteine totali
- Albumina
- Osmolalità sierica misurata
- Osmolalità sierica calcolata
- Divario osmolale
- Leishmania (IFI)

- *Esami coprologici*

In concomitanza con le analisi ematologiche, sia prima dell'inizio della sperimentazione sia a intervalli regolari durante il suo svolgimento, sono stati condotti esami coprologici mediante il metodo della flottazione sui campioni fecali dei soggetti, al fine di rilevare l'eventuale presenza di parassiti intestinali. Inoltre, sono stati effettuati test diagnostici di tipo ELISA sulle feci per escludere infezioni da *Giardia*.

Tutti i cani coinvolti sono risultati clinicamente sani e valutati in buono stato di salute.

- *Performance zootecniche*

Sono stati monitorati i seguenti indicatori zootecnici:

- BW (Peso corporeo)
- BCS (Body Condition Score)
- MCS (Muscle Condition Score)
- FCS (Fecal Consistency Score)

Peso corporeo

Il monitoraggio del peso corporeo è fondamentale per rilevare, a intervalli prestabiliti, eventuali variazioni di peso nei soggetti di entrambi i gruppi, in relazione al tipo di alimentazione somministrata. Le misurazioni sono state effettuate su animali a digiuno, nei giorni programmati, alle 9:00 del mattino, utilizzando una bilancia elettronica a piattaforma (EOS 150K100NXL, Kern & Sohn GMBH; Balingen, Germania) (Figura 7).



Figura 7 – Determinazione del peso corporeo

Body Condition Score

Il Body Condition Score (BCS) è un metodo di valutazione dello stato nutrizionale degli animali, basato su osservazione visiva e palpazione. Per le prove sperimentali è stata adottata una scala a 9 punti, in cui il punteggio 1 indica un soggetto estremamente magro, mentre il punteggio 9 corrisponde a un soggetto obeso. Il punteggio ideale, indicativo di una condizione corporea ottimale, si colloca generalmente tra 4 e 5 sulla scala di riferimento (Laflamme, 1997).

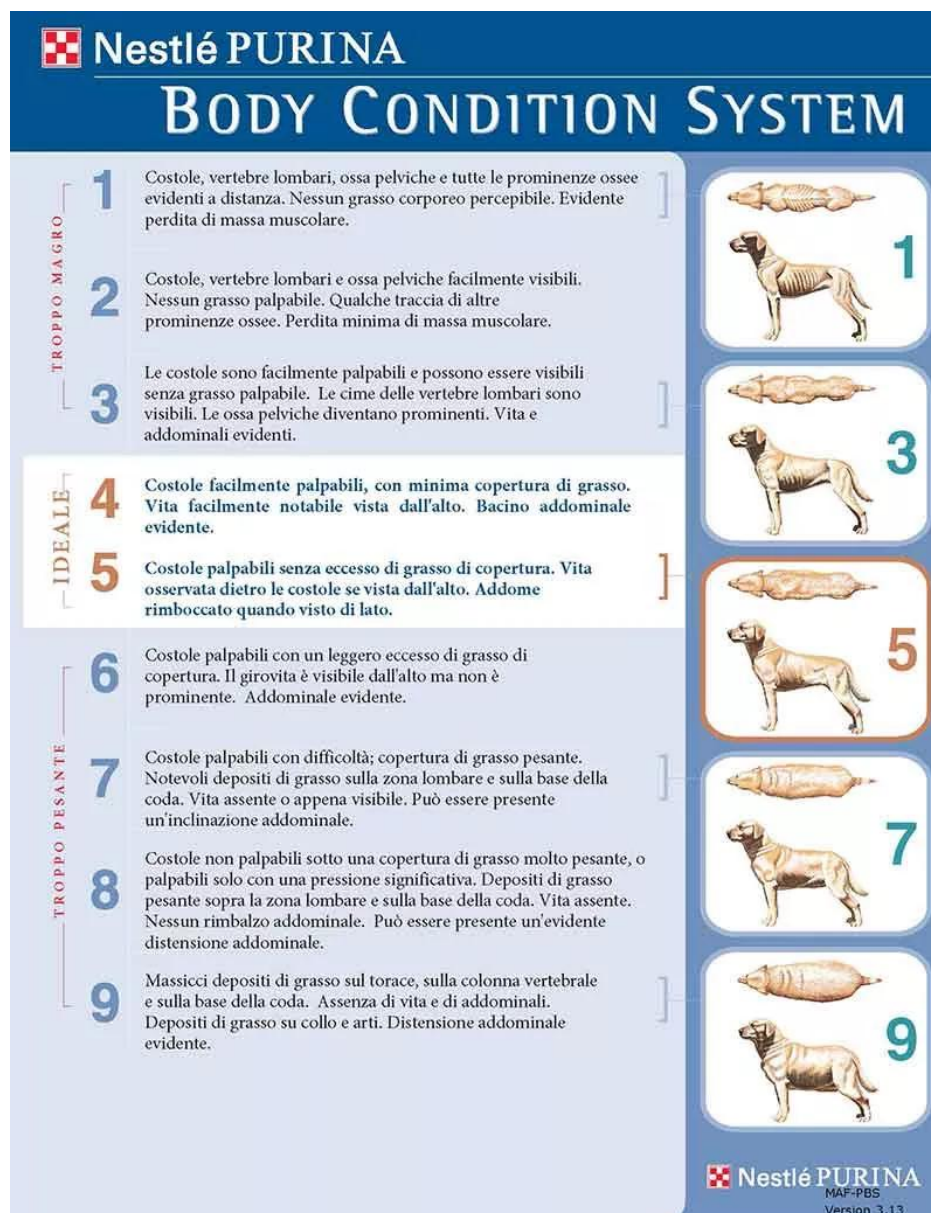


Figura 8 - Valutazione BCS nel cane (Nestlé Purina)

Muscle Condition Score

Il Muscle Condition Score (MCS) è una scala da 1 a 4, utilizzata per valutare la quantità di massa muscolare dell'animale. L'analisi si basa sia sull'osservazione visiva sia sulla palpazione di specifiche aree muscolari situate sopra le ossa temporali, le scapole, la colonna lombare e la pelvi.

La Figura 9 riporta le linee guida nutrizionali della World Small Animal Veterinary Association (WSAVA, 2011), e i criteri della scala a 4 punti (1 = nessuna perdita

muscolare; 2 = lieve perdita muscolare; 3 = moderata perdita muscolare; 4 = una perdita di massa muscolare grave).





DESCRIZIONE	FIGURA
NESSUNA PERDITA MUSCOLARE	
LIEVE PERDITA MUSCOLARE	
MODERATA PERDITA MUSCOLARE	
SEVERA PERDITA MUSCOLARE	

Figura 9 – Valutazioni MCS (WSAVA, 2011)

Fecal Consistency Score

La consistenza delle feci nel cane rappresenta un parametro fondamentale per il monitoraggio dello stato di salute dell'apparato digerente e, più in generale, del benessere dell'animale. Il punteggio fecale che si assegna può fornire indicazioni utili per rivelare la presenza di parassiti, condizioni di disidratazione, situazioni di stress o eventuali patologie gastrointestinali. Il Fecal Score System è uno strumento che consente di valutare la consistenza delle feci esaminando l'aspetto e la compattezza, assegnando un punteggio su una scala da 1(feci secche) a 5(feci liquide) in accordo alla tabella proposta da Waltham Fecal Score (Moxham, 2001) (Figura 10).

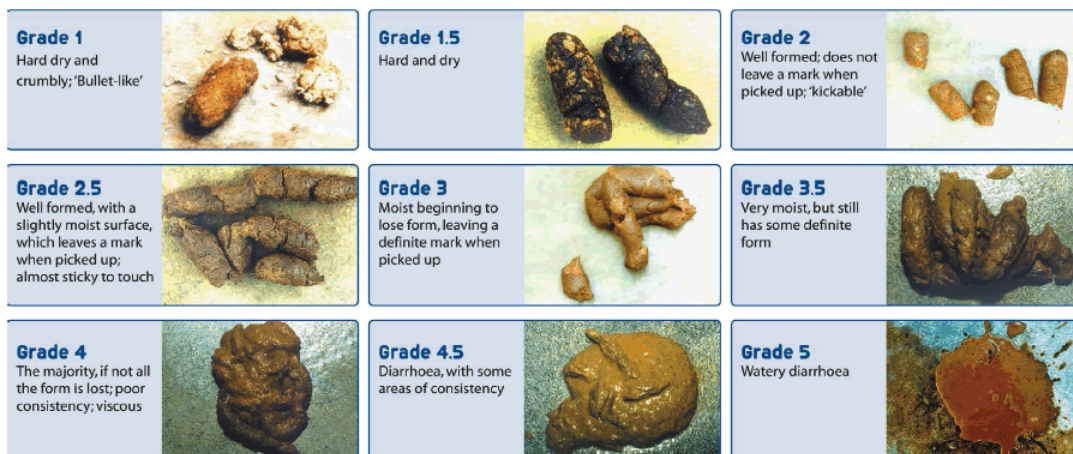


Figura 10 – Valutazione FCS

Durante l'intero periodo sperimentale di 45 giorni, per entrambe le prove e nelle date prestabilite, è stata prevista la presenza continuativa di un tecnico qualificato (dalle ore 8:00 alle 22:00), sempre lo stesso, incaricato della raccolta delle feci e della valutazione delle performances zootecniche. La registrazione delle performance zootecniche è stata effettuata utilizzando la scheda di rivelazione mostrata in Figura 11.


IMPRESSE E COMPETITIVITÀ
 2014-20
 Riaccendiamo lo sviluppo



 UNIONE EUROPEA
 Fondo Europeo di Sviluppo Regionale


 Ministero dello Sviluppo Economico

**VALORIZZAZIONE MANGIMISTICA DI SCARTI BIOLOGICI DELLA PRODUZIONE AVICOLA,
 DI CASCAME TERMICO INDUSTRIALE E DI CO₂ - BIO=C=O**

PON "IMPRESSE E COMPETITIVITÀ" 2014-2020 FESR, ASSE I - INNOVAZIONE, AZIONE 1.1.3,
 AREA TEMATICA: AGRIFOOD - Progetto n. F/200078/03/X45 – CUP B41B20000280005

SCHEDA RILIEVI GIORNALIERI
 GIORNO PROVA N° _____ DATA _____

ID SOGGETTO	MICROCHIP	BCS	MCS	FCS	PESO
1					
2					
3					
4					
5					
6					

Figura 11 – Scheda rilievi giornalieri

3.2.1 Trial 1

La prima prova ha avuto inizio il 22 giugno 2023 ed è terminata il 27 ottobre 2023. La prova si è svolta in un allevamento sito a Messina (ME). Il proprietario, dopo aver preso visione del progetto e del relativo protocollo di lavoro, ha accettato e sottoscritto la lettera d'intenti permettendo l'accesso alle strutture di sperimentazione al personale afferente all'Unità di Produzione Animale del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'università di Messina e quindi, lo svolgimento delle attività riportate nel progetto presso l'allevamento di sua proprietà.

Sono stati coinvolti 6 cani adulti femmina di razza Setter Inglese, regolarmente iscritti ai Libri Genealogici dell'ENCI, con età media di 60 ± 34 mesi. I cani sono stati divisi in due gruppi, controllo (CTR) e trattato (TRT), omogeni per peso corporeo (CTR = 16,5 kg; TRT = 16,5 kg), per BCS (CTR = 5; TRT = 5, su una scala da 1 a 9), per MCS (CTR = 1; TRT = 1, su una scala da 1 a 4) e FCS (CTR = 2,5; TRT = 2,5, su una scala da 1 a 5).

Ogni cane disponeva di una ciotola singola per l'alimentazione e la dieta veniva somministrata una volta al giorno, intorno alle ore 20:00. L'acqua era sempre disponibile.

3.2.2 Trial 2

La seconda prova è iniziata il 12 settembre 2023 ed è terminata il 23 novembre 2023. La prova si è svolta in un allevamento sito a Barcellona Pozzo di Gotto (ME), in provincia di Messina. Il proprietario, dopo aver preso visione del progetto e del relativo protocollo di lavoro, ha accettato e sottoscritto la lettera d'intenti permettendo l'accesso alle strutture di sperimentazione al personale afferente all'Unità di Produzione Animale del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'università di Messina e quindi, lo svolgimento delle attività riportate nel progetto presso l'allevamento di sua proprietà.

I soggetti coinvolti sono stati 8 cani adulti di razza Setter Inglese, 4 maschi (età: 65 ± 43 mesi) e 4 femmine (età: 12 ± 0 mesi), regolarmente iscritti ai Libri Genealogici dell'ENCI. Le femmine sono state suddivise in due gruppi (FCTR e FTRT), omogenei per peso corporeo (FCTR = 16,1 kg; FTRT = 16,8 kg), per BCS (FCTR: 5; FTRT: 5, su una scala da 1 a 9), per MCS (FCTR: 1; FTRT: 1, su una scala da 1 a 4) e FCS (FCTR: 2,5; FTRT: 2,5, su una scala da 1 a 5).

I maschi sono stati suddivisi in due gruppi (MCTR e MTRT), omogenei per peso corporeo (MCTR = 21,9 kg; MTRT = 21,6 kg), BCS (MCTR: 5; MTRT: 5, su una scala da 1 a 9), MCS (MCTR: 1; MTRT: 1, su una scala da 1 a 4) e FCS (MCTR: 2,3; MTRT: 2,3, su una scala da 1 a 5).

Ogni cane disponeva di una ciotola singola per l'alimentazione e la dieta veniva somministrata una volta al giorno, intorno alle ore 20:00. L'acqua era sempre disponibile.

3.3 DISEGNO SPERIMENTALE

3.3.1 *Trial 1*

La prima prova ha seguito un disegno sperimentale crossover, con sei cani per gruppo (CTR e TRT), due fasi (R1 e R2) e due trattamenti dietetici (PM e HFM). Nel gruppo CTR, i cani sono stati alimentati con la dieta PM contenente farina di pollo, mentre quelli del gruppo TRT hanno ricevuto la dieta HFM contenente farina di piume idrolizzate durante la prima fase (R1), invertendo i trattamenti nella seconda fase (R2).

Ciascuna fase (R1 e R2) ha incluso 7 giorni di adattamento alle diete sperimentali, con l'obiettivo di abituare gli animali alla dieta e regolare l'assunzione di cibo per mantenere il peso corporeo, seguiti da 45 giorni di raccolta totale delle feci (periodi di raccolta R1 e R2) a diversi timepoint (0, 3, 7, 15 e 45 giorni). Inoltre, tra R1 e R2 è stato previsto un periodo di washout di 30 giorni, durante il quale i cani sono stati alimentati con la dieta PM (Figura 12).

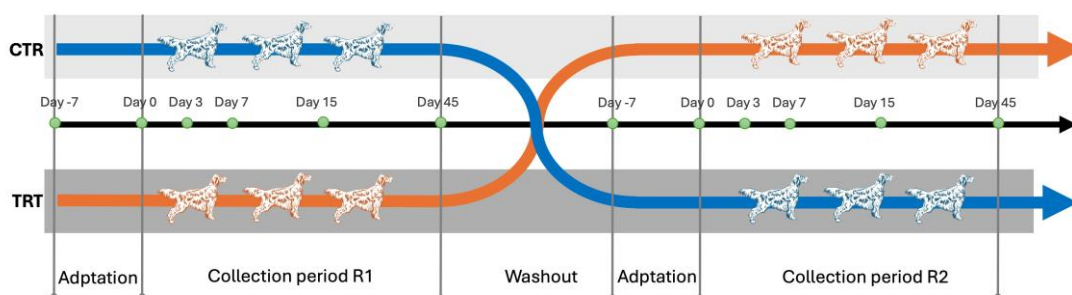


Figura 12 – Illustrazione disegno sperimentale *trial 1*

Per calcolare il fabbisogno di energia metabolizzabile (FEM), è stata impiegata l'equazione allometrica proposta dalla FEDIAF (2021), per cani adulti con attività fisica bassa (<1h/d):

$$FEM = 95 \times PC^{0.75}$$

- *Calcolo FEM fase R1*

Prendendo in considerazione il peso corporeo degli animali:

$$FEM = 95 \times 16,40^{0.75} = 774 \text{ kcal/capo/d (gruppo CTR e TRT)}$$

La quantità di alimento somministrato è stata determinata in funzione del FEM e del DEM, seguendo il rapporto:

$$Q = FEM/DEM$$

$$Q = 774/3677 = 210 \text{ g/capo/d (gruppo CTR)}$$

$$Q = 774/3772 = 205 \text{ g/capo/d (gruppo TRT)}$$

Di conseguenza, la razione giornaliera iniziale di mangime somministrata a ciascun soggetto è stata approssimata a 210 g per entrambi i gruppi. Tuttavia, al quindicesimo giorno dall'avvio della prova, in seguito all'andamento delle performance zootecniche osservate, la quantità è stata incrementata a 230 g per capo al giorno, mantenendo tale livello fino al termine della fase R1.

- *Calcolo FEM fase R2*

Prendendo in considerazione il peso corporeo degli animali:

$$FEM = 95 \times 17,30^{0.75} = 805 \text{ kcal/capo/d (gruppo CTR)}$$

$$FEM = 95 \times 16,70^{0.75} = 784 \text{ kcal/capo/d (gruppo TRT)}$$

La quantità di alimento somministrato è stata determinata in funzione del FEM e del DEM, seguendo il rapporto:

$$Q = FEM/DEM$$

$$Q = 805/3677 = 219 \text{ g/capo/d (gruppo CTR)}$$

$$Q = 784/3772 = 209 \text{ g/capo/d (gruppo TRT)}$$

In seguito alle valutazioni effettuate durante la fase R1 della sperimentazione e considerando le performances dei cani, è stata stabilita una razione giornaliera di mangime, arrotondata per eccesso pari a 230 g per capo al giorno per entrambi i gruppi, mantenendo tale livello fino al termine della fase R2.

3.3.2 Trial 2

La seconda prova ha previsto una fase iniziale di “wash-in” della durata di 30 giorni, durante la quale entrambi i gruppi sono stati alimentati con la dieta contenente solo farina di pollo. Successivamente, è stata effettuata una fase di adattamento alle diete sperimentali di 7 giorni, e 45 giorni di raccolta totale delle feci a diversi timepoint (0, 3, 7, 15 e 45 giorni) (Figura 13).

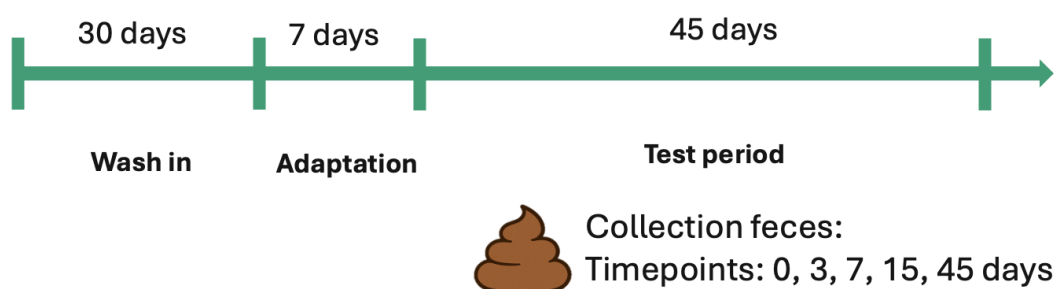


Figura 13 – Illustrazione disegno sperimentale *trial 2*

Per calcolare il fabbisogno di energia metabolizzabile (FEM), è stata impiegata l’equazione allometrica proposta dalla FEDIAF (2021), per cani adulti con attività fisica moderata (1–3 ore/giorno),

$$FEM = 125 \times PC^{0.75}$$

- *Calcolo FEM*

Prendendo in considerazione il peso corporeo degli animali:

$$FEM = 125 \times 16,10^{0.75} = 927 \text{ kcal/capo/d (gruppo FCTR - Femmine)}$$

$$FEM = 125 \times 16,80^{0.75} = 971 \text{ kcal/capo/d (gruppo FTRT - Femmine)}$$

$$FEM = 125 \times 21,90^{0.75} = 1217 \text{ kcal/capo/d (gruppo MCTR - Maschi)}$$

$$FEM = 125 \times 21,60^{0.75} = 1198 \text{ kcal/capo/d (gruppo MTRT - Maschi)}$$

La quantità di alimento somministrato è stata determinata in funzione del FEM e del DEM, seguendo il rapporto:

$$Q = FEM/DEM$$

$$Q = 927/3677 = 252 \text{ g/capo/d (gruppo FCTR - Femmine)}$$

$$Q = 971/3772 = 257 \text{ g/capo/d (gruppo FTRT - Femmine)}$$

La razione giornaliera di mangime per le femmine di entrambi i gruppi è stata arrotondata per eccesso a 280 g/capo/d.

$$Q = 1217/3677 = 331 \text{ g/capo/d (gruppo MCTR - Maschi)}$$

$$Q = 1198/3772 = 318 \text{ g/capo/d (gruppo MTRT - Maschi)}$$

La razione giornaliera di mangime per i maschi di entrambi i gruppi è stata arrotondata per eccesso a 340 g/capo/d.

Tuttavia, dal quindicesimo giorno dall'inizio della prova, in seguito all'andamento delle performance zootecniche osservate nella prima settimana, la quantità è stata ridotta a 320 g/capo/d.

3.4 RACCOLTA DELLE FECI E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI FECALI

I campioni fecali sono stati raccolti nei giorni 0, 3, 7, 15 e 45 da un tecnico specializzato, che ha valutato il punteggio di consistenza fecale (FCS) per ciascun timepoint e prelevato i campioni di feci per le relative analisi.

3.4.1 Preparazione del campione fecale per le analisi del microbiota

I campioni fecali destinati al sequenziamento del microbiota sono stati raccolti al mattino per due giorni consecutivi: giorno 0 e giorno 1 per T0, giorno 3 e giorno 4 per T3, giorno 7 e giorno 8 per T7, giorno 15 e giorno 16 per T15, e giorno 45 e giorno 46 per T45. I prelievi sono stati effettuati sempre alla stessa ora, alle ore 9:00, utilizzando provette con tappo a vite contenenti il mezzo di trasporto e conservazione eNAT® (eNAT® tubes, Copan, Brescia, Italia). I campioni sono stati conservati immediatamente in ambiente buio a temperatura ambiente, nel rispetto delle indicazioni specifiche previste per il corretto utilizzo del mezzo eNAT®, e successivamente inviati al Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali dell'Università degli Studi di Udine che ha provveduto all'estrazione e sequenziamento del microbiota fecale.

3.4.2 Preparazione del campione fecale per le analisi della digeribilità apparente

Tutti i campioni, relativi a ciascun gruppo (CTR e TRT), sono stati prelevati entro 15 minuti dalla defecazione e trasportati immediatamente in un contenitore termico in polistirene presso i laboratori dell'Unità di Produzione Animale del

Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università degli studi di Messina, situati nelle vicinanze degli allevamenti. All'arrivo in laboratorio, i campioni fecali sono stati pesati, raggruppati in base al trattamento dietetico e omogeneizzati per le successive determinazioni analitiche.

3.4.3 Preparazione del campione fecale per le analisi dei prodotti della fermentazione

Una parte dei campioni fecali freschi è stata suddivisa in due aliquote. Una prima aliquota è stata diluita in rapporto 1:5 (peso/volume) in acido metafosforico al 25% per l'estrazione degli acidi grassi a corta catena (SCFA – Short Chain Fatty Acids) e degli acidi grassi ramificati (BCFA – Branched Chain Fatty Acids) (Chiofalo et al., 2019). I campioni diluiti sono stati centrifugati a 20.000 g per 20 minuti a 4 °C. Il surnatante è stato quindi raccolto e conservato a -20 °C in attesa delle analisi. La seconda aliquota, raccolta in provette e anch'essa conservata a -20 °C fino al momento dell'analisi, è stata utilizzata per la determinazione delle concentrazioni di ammine biogene e per l'analisi della composizione chimica ai fini della valutazione della digeribilità apparente.

3.5 ANALISI DEL MICROBIOTA

Il DNA è stato estratto su 150 mg di materiale fecale utilizzando il kit Fecal DNA MiniPrep (Zymo Research; Irvine, CA, USA), secondo le istruzioni del produttore e includendo una fase iniziale di omogeneizzazione meccanica. La concentrazione del DNA estratto è stata determinata mediante fluorimetro Qubit™ 3 (Thermo Scientific; Waltham, MA, USA). Dopo l'estrazione, le librerie sono state preparate mediante l'amplificazione delle regioni ipervariabili V3 e V4 del gene 16S rRNA, utilizzando i primer 341F (*CCTAYGGGRBGCASCAG*) e 806R (*GGACTACNNGGGTATCTAAT*), con successivo inserimento degli indici di sequenziamento. Questa fase è stata condotta utilizzando il kit NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit (Codice catalogo E7645), secondo le indicazioni del produttore. Gli ampliconi ottenuti sono stati sequenziati sulla piattaforma NovaSeq 6000 (Illumina; San Diego, CA, USA), utilizzando una cella di flusso SP in modalità paired-end 2 × 250, seguendo i protocolli standard. La profondità di sequenziamento prevista era di 50.000 reads per campione. I dati grezzi di sequenziamento sono stati depositati

nell'archivio pubblico NCBI Sequence Read Archive con il numero di accesso PRJNA1079213.

3.6 DIGERIBILITA' APPARENTE

Al termine dei periodi di campionamento delle due prove sperimentali, le feci sono state pesate e sottoposte ad analisi chimiche per determinarne il contenuto in proteina grezza (PG), grassi, ceneri e amido. Ogni analisi chimica è stata eseguita in doppio.

Tutte le feci raccolte sono state pesate e, in un sottocampione pari al 10% di ciascun campione di feci fresche, è stata determinata la sostanza secca, utilizzando la metodica (AOAC, 2010) già descritta per le diete. La restante parte dei campioni fecali è stata successivamente conservata a -20°C fino all'esecuzione delle analisi. Al termine dei periodi di campionamento, i campioni fecali sono stati analizzati per il contenuto di proteina grezza, grassi, ceneri e amido secondo quanto riportato per le diete (AOAC, 2010; AOAC, 2019). La proteina grezza è stata calcolata a partire dal contenuto di azoto analizzato, moltiplicato per il fattore di conversione 6,25 (Xu et al., 2017).

I risultati ottenuti dalle analisi chimiche delle diete e delle feci sono stati utilizzati per calcolare la digeribilità apparente a livello dell'intero tratto digestivo della sostanza secca (s.s.), sostanza organica (SO), proteina grezza (PG), grassi e amido nei gruppi CTR e TRT, utilizzando la seguente equazione (Kerr et al., 2013):

$$\begin{aligned} \text{Digeribilità apparente (\%)} &= \\ &= \frac{\text{Nutrient intake } \left(\frac{g}{d}\right) - \text{Fecal nutrient output } \left(\frac{g}{d}\right)}{\text{Nutrient intake } \left(\frac{g}{d}\right)} \times 100 \end{aligned}$$

Dove:

Nutrient intake = Apporto del nutriente

Fecal nutrient output = Escrezione fecale del nutriente

3.7 ANALISI DEGLI ACIDI GRASSI VOLATILI

Gli SCFA e i BCFA sono stati analizzati mediante gascromatografia secondo il metodo di Chiofalo et al. (2019). È stato utilizzato un gascromatografo Dani Master GC1000 (Dani Instrument, Milano, Italia) dotato di un rivelatore a ionizzazione di

fiamma (FID) (Dani Instrument, Milano, Italia). La separazione è stata effettuata con una colonna capillare in silice fusa SUPELCO SPB (15 m × 0,2 mm, 0,2 µm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) utilizzando l'elio come gas di trasporto a una velocità lineare costante di 30 cm/s. La temperatura iniziale del forno è stata programmata a 40 °C per 3 minuti, poi aumentata fino a 160 °C con una velocità di 20 °C/min, successivamente portata a 245 °C con una velocità di 40 °C/min e mantenuta a 245 °C per 2 minuti. Le temperature del rivelatore FID e dell'iniettore erano impostate a 280 °C. Il volume di iniezione è stato di 1 µL, con un rapporto di split di 1:25 e un flusso di split pari a 12,5 ml/min. L'elaborazione dei dati è stata effettuata tramite il software Clarity Chromatography Software v. 4.0.2 (Dani Instrument, Milano, Italia). L'identificazione e la quantificazione di acetato, propionato, butirrato e isobutirrato sono state eseguite confrontando i tempi di ritenzione con quelli degli standard di riferimento (Merck Spa, Sigma-Aldrich, Milano, Italia) mediante curve analitiche esterne. Nelle soluzioni standard, il limite di quantificazione (LOQ) (rapporto segnale/rumore >10) era di 1 mmol/g per tutti gli analiti. Il tempo totale di corsa era di 12 minuti. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato, e i risultati relativi ad acetato, propionato, butirrato, isobutirrato, agli acidi grassi a corta catena totali (SCFA) e somma degli acidi organici (SOA) sono stati espressi in µmol/g.

3.8 ANALISI DELLE AMMINE BIOGENE

Le ammine biogene (triptofano, fenilettilammina, putrescina, cadaverina, istamina, tiramina, spermidina e spermina) sono state estratte secondo la metodica descritta da Flickinger et al. (2003). In breve, 2 g di materiale fecale sono stati miscelati con 15 ml di acido perclorico (0,4 mol/L) e centrifugati a 2.000 g per 10 minuti a 4 °C. Successivamente, dopo aver recuperato il surnatante, sono stati aggiunti 7 ml di acido perclorico (0,4 mol/L) al pellet fecale residuo, mescolati accuratamente e centrifugati nuovamente a 2.000 g per 10 minuti a 4 °C. I surnatanti sono stati combinati e centrifugati a 12.500 g per 5 minuti a 4 °C e analizzati tramite HPLC (Shimadzu Italia, Milano, Italia) accoppiato a un rivelatore a fluorescenza RF-20A (FLD, Shimadzu Italia, Milano, Italia), applicando le stesse procedure utilizzate per le diete. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato e i risultati sono stati espressi in mg/g.

3.9 ANALISI STATISTICA

3.9.1 Analisi statistica del contenuto in amminoacidi e ammine biogene delle diete sperimentali

Per valutare le differenze degli amminoacidi e delle ammine biogene delle due diete sperimentali, è stato utilizzato un t-test per campioni indipendenti, adottando un livello di significatività più stringente ($\alpha = 0,01$) a causa del ridotto numero di repliche disponibili.

3.9.2 Trial 1: Analisi statistica delle performances

Per la valutazione delle performance è stata effettuata un'analisi della varianza mediante modello misto (XLSTAT, v. 2021.2.2, Microsoft Excel, Parigi, Francia), considerando effetti fissi la Dieta (PM e HFM) e il Tempo (T0, T3, T7, T15 e T45). In ogni modello è stata inclusa l'interazione Dieta \times Tempo. Gli effetti casuali sono stati rappresentati dal singolo cane e dal periodo (R1 e R2). I residui sono stati verificati per la normalità e sono risultati normalmente distribuiti. Sono state calcolate le medie ai minimi quadrati (LSM) e l'errore standard della media (SEM). Il confronto tra le LSM è stato effettuato con il test di Tukey, considerando significative le differenze per $P < 0,05$.

3.9.3 Trial 1: Analisi statistica del microbiota

Per l'analisi del microbiota, le sequenze grezze iniziali (FASTQ) ottenute dai campioni sono state elaborate utilizzando il software Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 (QIIME 2) (Bolyen et al., 2019). Dopo il demultiplexing, sono state selezionate le letture con punteggio di qualità Phred ≥ 30 e sono state rimosse le chimere. Le sequenze di alta qualità rimanenti sono state quindi raggruppate in varianti di sequenza di ampliconi (ASV) e confrontate con il database Greengenes (<https://greengenes.secondgenome.com>) per l'identificazione del gene 16S rRNA. L' α -diversity dei campioni fecali, in relazione ai fattori dieta, interazione Dieta \times Tempo e replicati biologici, è stata valutata mediante la curva di rarefazione di Shannon. L'evenness è stata confrontata utilizzando il test non parametrico di Kruskal-Wallis a coppie. Per la valutazione della β -diversity, è stata costruita una filogenesi basata sulla distanza weighted-UniFrac (Lozupone et al., 2007) e i risultati sono stati visualizzati attraverso grafici di Principal Coordinate Analysis (PCoA). Inoltre, la β -diversity è stata misurata con Bray-Curtis e l'analisi LefSe. Le differenze nella

composizione della comunità microbica sono state analizzate mediante un'analisi multivariata permutazionale della varianza (PERMANOVA). L'abbondanza relativa (RA) è stata calcolata e riportata come numero di letture ogni 1000 letture totali. Per identificare i taxa significativi inclusi nella funzione di classificazione, è stata effettuata un'analisi discriminante (DA) con metodo stepwise, con un valore di ingresso $P = 0,05$ e un valore di rimozione $P = 0,10$, considerando la dieta come variabile dipendente. Le differenze significative tra i taxa, così come tra quelli inclusi nella funzione di classificazione dell'analisi DA, sono state valutate tramite il test non parametrico di Kruskal-Wallis.

3.9.4 Trial 1: Analisi statistica della digeribilità e dei prodotti della fermentazione

Le differenze significative degli acidi organici, delle ammine biogene e della digeribilità apparente tra i gruppi TRT e CTR sono state valutate mediante un modello lineare generalizzato misto (GLMM). Ogni parametro analitico è stato considerato come variabile di risposta, mentre Dieta (PM o HFM), Tempo (T0, T3, T7, T15 e T45) e la loro interazione sono stati inclusi come effetti fissi. La fase sperimentale è stata trattata come variabile casuale. Per le variabili continue a supporto positivo (cioè >0), è stata utilizzata la funzione 'glmer' del pacchetto 'lme4' v1.1-37 per R (Bates et al., 2014), adottando una distribuzione Gamma con funzione di collegamento inversa. Mentre per le variabili espresse in percentuale, è stata utilizzata una funzione di famiglia beta con link logit, implementata tramite la funzione glmmTMB del pacchetto glmmTMB di R (Brooks et al., 2017). La selezione del modello si è basata sul criterio di informazione di Akaike (AIC), e la verifica delle assunzioni del modello è stata effettuata tramite la valutazione grafica dei residui. Il pacchetto 'emmeans' v1.11.1 (Bates et al., 2014) è stato utilizzato per calcolare le medie marginali stimate e per valutare i contrasti tra trattamenti. La significatività statistica per i test GLMM è stata fissata a $\alpha = 0,05$.

3.9.5 Trial 2: Analisi statistica delle performances

I dati relativi a BCS, MCS e FCS sono stati analizzati mediante modelli di regressione ordinale, considerando gli effetti di Dieta, Dieta \times Tempo di campionamento e Sesso. I dati relativi al peso corporeo (BW), invece, sono stati analizzati con un modello misto, includendo come effetti fissi Dieta, Dieta \times Tempo di campionamento e Sesso, mentre come effetto casuale è stato considerato il singolo

cane. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software XLSTAT (Addinsoft, Paris, France, 2022).

3.9.6 Trial 2: Analisi statistica del microbiota

Per l'analisi del microbiota, le sequenze grezze iniziali (FASTQ) sono state elaborate e confrontate con il database Greengenes per il gene 16S rRNA, seguendo le procedure descritte per la prima prova. I dati ottenuti sono stati poi caricati sulla piattaforma MicrobiomeAnalyst (<https://www.microbiomeanalyst.ca/>) per l'analisi statistica e integrativa del microbiota, e normalizzati in termini di abbondanza relativa (RA). I valori di abbondanza relativa (RA) sono stati impiegati per calcolare l'indice di α -diversity di Shannon. I confronti relativi ai fattori Dieta, Dieta \times Tempo di campionamento e Sesso sono stati effettuati mediante il test di Mann-Whitney, con correzione per confronti multipli applicata tramite il metodo di Benjamini-Hochberg (FDR). Le differenze nella β -diversity (indice Bray-Curtis) relative a Dieta, Dieta \times Tempo di campionamento e Sesso sono state calcolate e visualizzate tramite grafici di Principal Coordinate Analysis (PCoA). La composizione microbica è stata confrontata mediante analisi della varianza multivariata permutazionale (PERMANOVA). Infine, per valutare le differenze di abbondanza relativa tra le variabili Dieta, Dieta \times Tempo di campionamento e Sesso, è stata applicata l'analisi LEfSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size) (Segata et al., 2011).

3.9.7 Trial 2: Analisi statistica della digeribilità e dei prodotti della fermentazione

Le differenze significative negli acidi organici, ammine biogene e digeribilità apparente tra i gruppi TRT e CTR della seconda prova sperimentale sono state valutate utilizzando un modello lineare generalizzato misto (GLMM). Ogni parametro analitico considerato è stato utilizzato come variabile di risposta, con Dieta (PM o HFM), Tempo (T0, T3, T7, T15 e T45) e la loro interazione Dieta \times Tempo inseriti come effetti fissi, mentre il sesso è stato trattato come variabile casuale. Le funzioni impiegate per le variabili continue e percentuali sono le stesse adottate nella prima prova. La significatività statistica è stata fissata a $\alpha = 0,05$.

4. RISULTATI

4.1 DIETE

4.1.1 Amminoacidi

In Tabella 2 sono riportati i risultati relativi al profilo degli amminoacidi nelle due diete sperimentali. Come è possibile notare dall'analisi statistica non emergono differenze significative nel profilo degli amminoacidi delle due diete ad eccezione della serina, che ha fatto registrare valori significativamente ($p < 0.05$) più alti nel mangime contenente piume di pollo rispetto al mangime contenente solo farina di pollo.

Tabella 2 - Composizione aminoacidica delle diete sperimentali (g/100 g, t.q.).

	Diete		
	PM ¹	HFM ²	p-value
<i>Amminoacidi essenziali</i>			
Arginina	1,62	1,67	0,321
Istidina	0,37	0,36	0,519
Isoleucina	0,90	0,91	0,519
Leucina	1,49	1,50	0,225
Lisina	0,80	0,81	0,184
Metionina	0,40	0,44	0,053
Fenilalanina	1,01	1,03	0,036
Triptofano	0,27	0,27	0,742
Treonina	0,72	0,73	0,057
Valina	1,23	1,26	0,281
<i>Amminoacidi non essenziali</i>			
Serina	2,13b	2,20a	0,002
Prolina	1,65	1,72	0,075
Alanina	0,65	0,68	0,092
Glicina	1,63	1,66	0,244
Acido aspartico + Asparagina	1,23	1,25	0,139
Idrossiprolina	0,51	0,53	0,038
Acido glutammico + Glutamina	1,82	1,91	0,222
Idrossilisina	0,45	0,46	0,101
Tirosina	0,57	0,58	0,057
Cisteina	0,41	0,42	0,134

¹ Dieta PM: dieta con farina di pollo (16%).

² Dieta HFM: dieta con farina di pollo (9%) e farina di piume idrolizzate (7%).

^{a,b} per $p \leq 0,01$

4.1.2 Ammine biogene

In Tabella 3 sono riportati i risultati relativi al contenuto in ammine biogene delle due

diete sperimentali. Differenze statisticamente significative ($p < 0.01$) sono state osservate solamente per la cadaverina che ha mostrato un contenuto più elevato nel mangime contenente piume di pollo rispetto al mangime contenente solo farina di pollo.

Tabella 3 – Contenuto di ammine biogene delle diete sperimentali (mg/g, t.q.).

	Diete		p-value
	PM ¹	HFM ²	
Triptamina	0,012	0,023	0,016
Fenilettilamina	0,014	0,029	0,019
Putrescina	0,140	0,171	0,025
Cadaverina	0,082b	0,124a	0,009
Istamina	0,007	0,005	0,312
Tiramina	0,008	0,017	0,057
Spermidina	0,004	0,004	0,699
Spermina	0,192	0,210	0,087
Somma delle ammine biogene	0,458	0,583	0,020

¹ Dieta PM: dieta con farina di pollo (16%).

² Dieta HFM: dieta con farina di pollo (9%) e farina di piume idrolizzate (7%).

a,b per $p \leq 0,01$

4.2 PERFORMANCE ZOOTECHNICHE

4.2.1 Trial 1

I cani coinvolti nello studio hanno mantenuto un buono stato di salute generale per l'intera durata della prova. Tutti i cani, sia del gruppo CTR sia del gruppo TRT, hanno consumato quotidianamente l'intera razione alimentare prevista.

La Tabella 4 riporta i risultati relativi all'andamento delle performance (peso corporeo, BCS, MCS e FCS) nei due gruppi sperimentali (CTR e TRT) in funzione del Tempo (da T0 a T45), della Dieta e dell'interazione Dieta x Tempo.

Non sono emerse differenze significative nel peso corporeo durante l'intero periodo sperimentale in relazione alla Dieta, al Tempo e alla loro interazione Dieta x Tempo. Cionondimeno, i cani del gruppo TRT hanno mostrato un lieve aumento di peso corporeo al termine della prova (T45 = 17,30 kg) rispetto a quelli del gruppo CTR (T45 = 16,90 kg).

Non sono state rilevate differenze significative nel BCS in relazione alla Dieta, al Tempo e all'interazione Dieta x Tempo. Per tutta la durata della prova, i cani hanno

mantenuto un BCS compreso nell'intervallo considerato ideale (punteggio tra 4,5 e 5,0 su 9), caratterizzato da coste palpabili senza eccesso di grasso di copertura, vita visibile posteriormente alle coste e addome retratto nella vista laterale.

Non sono state rilevate differenze significative ($p > 0,05$) nei valori di MCS in relazione alla Dieta, al Tempo e all'interazione tra Dieta x Tempo (Tabella 4). Al tempo T0, e per l'intera durata della prova, i cani di entrambi i gruppi hanno mostrato un punteggio di MCS leggermente superiore a 1 su 4, valore indicativo della presenza di una normale massa muscolare, e hanno mantenuto un punteggio simile fino all'ultima rilevazione (T45) (Tabella 4).

Al giorno 0 e per tutta la durata della prova, le feci dei cani di entrambi i gruppi hanno mantenuto una buona consistenza, con un punteggio di Fecal Consistency Score (FCS) compreso tra 2,5 e 3 su 5. Durante la prova, il valore di FCS ha mostrato un andamento variabile, che tuttavia non ha mai raggiunto la significatività statistica ($p > 0,05$), né in relazione alla Dieta, né al Tempo, né all'interazione tra Dieta x Tempo.

Tabella 4 – Risultati delle performance¹ durante la prima prova.

Tempo ²	Gruppi ³	BW (Kg)		BCS (1-9)		MCS (1-4)		FCS (1-5)					
		LSM	SEM	LSM	SEM	LSM	SEM	LSM	SEM				
T 0	CTR	16,80	0,635	4,50	0,398	1,33	0,185	2,50	0,216				
	TRT	16,90	0,635	5,00	0,398	1,17	0,185	2,50	0,216				
T 3	CTR	16,80	0,635	4,50	0,398	1,33	0,185	2,42	0,216				
	TRT	16,50	0,778	5,00	0,487	1,25	0,227	2,13	0,265				
T 7	CTR	16,70	0,635	4,50	0,398	1,33	0,185	2,75	0,216				
	TRT	16,60	0,696	5,00	0,435	1,20	0,203	2,50	0,237				
T 15	CTR	16,80	0,635	4,50	0,398	1,33	0,185	2,50	0,216				
	TRT	16,40	0,778	5,00	0,487	1,25	0,227	2,38	0,265				
T 45	CTR	16,90	0,696	5,00	0,435	1,20	0,203	2,70	0,237				
	TRT	17,30	0,898	5,33	0,562	1,20	0,262	2,67	0,307				
p-value ⁴		D	T	DxT	D	T	DxT	D	T	DxT	D	T	DxT
		0,914	0,964	0,996	0,154	0,926	0,996	0,379	0,763	0,999	0,895	0,297	0,416

¹ I valori sono medie dei minimi quadrati (LSM) ± errore standard della media (SEM).

² T0–T45: Giorni di raccolta delle feci.

³ CTR: cani alimentati con la dieta PM (contenente farina di pollo); TRT: cani alimentati con la dieta HFM (contenente farina di piume idrolizzate).

⁴ Valori di probabilità riferiti agli effetti della Dieta (D), del Tempo (T) e dell'interazione Dieta × tempo (DxT).

4.2.2 Trial 2

I cani coinvolti nello studio hanno mantenuto un buono stato di salute generale per l'intera durata della prova. Tutti i cani, sia del gruppo CTR sia del gruppo TRT, hanno consumato quotidianamente l'intera razione alimentare prevista.

In relazione alla dieta, il peso corporeo (BW), il BCS e il MCS non hanno mostrato variazioni significative tra i gruppi CTR e TRT (Tabella 5). Per quanto riguarda il sesso, come previsto, il peso corporeo dei maschi è risultato significativamente più alto ($p < 0,01$) rispetto a quello delle femmine, mentre non sono state riscontrate differenze significative per BCS, MCS e FCS. L'interazione Dieta x Tempo ha evidenziato valori significativamente più bassi ($p < 0,05$) per il FCS nel gruppo TRT ai tempi T0, T7 e T15 rispetto a T3 e T45, nonché rispetto ai valori registrati nel gruppo CTR. Tuttavia, a T45 il FCS non ha mostrato differenze significative tra i due gruppi. Nel complesso, i valori medi di BCS, MCS e FCS hanno indicato condizioni di salute generalmente buone nei cani coinvolti nello studio.

Tabella 5 – Risultati delle performance¹ durante la seconda prova.

	BW (Kg)		BCS (1-9)		MCS (1-4)		FCS (1-5)		
	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	
Dieta									
CTR	19,5	4,1	5,2	0,8	1,1	0,2	2,5	0,2	
TRT	16,6	3,0	5,0	0,0	1,0	0,0	2,3	0,3	
Sesso									
Maschio	16,6 ^B	1,1	5,0	0,0	1,0	0,0	2,4	0,2	
Femmina	22,6 ^A	2,5	5,2	0,8	1,1	0,2	2,4	0,3	
Dieta x Tempo									
CTR_T0	19,3	4,6	5,0	0,8	1,0	0,0	2,4 ^a	0,4	
CTR_T3	19,4	4,6	5,0	0,8	1,0	0,0	2,5 ^a	0,2	
CTR_T7	19,6	4,7	5,5	1,0	1,0	0,0	2,5 ^a	0,2	
CTR_T15	19,8	4,7	5,5	1,0	1,0	0,0	2,5 ^a	0,3	
CTR_T45	19,6	4,6	5,0	0,8	1,3	0,5	2,4 ^a	0,2	
TRT_T0	19,4	3,4	5,0	0,0	1,0	0,0	2,2 ^b	0,3	
TRT_T3	19,5	3,3	5,0	0,0	1,0	0,0	2,4 ^a	0,2	
TRT_T7	19,6	3,5	5,0	0,0	1,0	0,0	2,2 ^b	0,3	
TRT_T15	19,9	3,5	5,0	0,0	1,0	0,0	2,2 ^b	0,3	
TRT_T45	19,7	3,4	5,0	0,0	1,0	0,0	2,4 ^a	0,2	

d.s.: Deviazione Standard

T0–T45: Giorni di raccolta delle feci.

CTR: cani alimentati con la dieta PM (contenente farina di pollo); TRT: cani alimentati con la dieta HFM (contenente farina di piume idrolizzate).

A, B $p < 0,01$,a,b $p < 0,05$.

4.3 MICROBIOTA

4.3.1 Trial 1

L' α -diversità, che rappresenta il numero di taxa presenti (comunemente definita *richness*) non ha mostrato differenze significative tra i gruppi (TRT vs CTR), né in relazione all'interazione Dieta \times Tempo (Figura 14A). Inoltre, la curva di rarefazione ha confermato una profondità di sequenziamento ottimale, a supporto dell'affidabilità dei dati ottenuti.

L'*evenness*, che riflette l'equilibrio tra *richness* e abbondanza relativa dei singoli taxa (Figure 14B e 14C), è risultata significativamente più elevata ($p < 0,05$) nel gruppo TRT rispetto al gruppo CTR. Sebbene l'analisi dell'interazione Dieta \times

Tempo abbia evidenziato valori di *evenness* più omogenei, i confronti a coppie non sono risultati significativi.

Per quanto riguarda la β -diversity (Figure 15 e 16), che valuta le differenze nella composizione microbica tra i campioni in termini di presenza/assenza e l'abbondanza relativa dei taxa, sono emerse differenze significative tra le due diete ($p < 0,05$). Non sono invece state osservate differenze significative né per l'interazione Dieta \times Tempo, né tra le repliche biologiche. I valori di β -diversity sono stati rappresentati attraverso l'analisi PCoA (*Principal Coordinates Analysis*), fornendo una visualizzazione spaziale delle distanze tra i campioni.

L'analisi dell'abbondanza relativa (RA) dei *phyla* non ha evidenziato differenze significative tra e i due gruppi (Figura 17). Tuttavia, a livello tassonomico di famiglia, i *Peptostreptococcaceae* e i *Ruminococcaceae* sono risultati significativamente più abbondanti nel gruppo TRT rispetto al gruppo CTR.

L'analisi discriminante (DA), con la dieta come variabile dipendente, ha selezionato 9 taxa rilevanti (Tabella 6). Il test di Kruskal-Wallis applicato a questi taxa ha evidenziato una RA significativamente più alta nel gruppo CTR per *Streptococcus*, *Collinsella stercoris*, *Ruminococcus gnavus* e *Bacteroides coprophilus* (Figura 18). Al contrario, una RA più elevata è stata osservata nel gruppo TRT per *Peptostreptococcaceae* e *Bacteroides uniformis*.

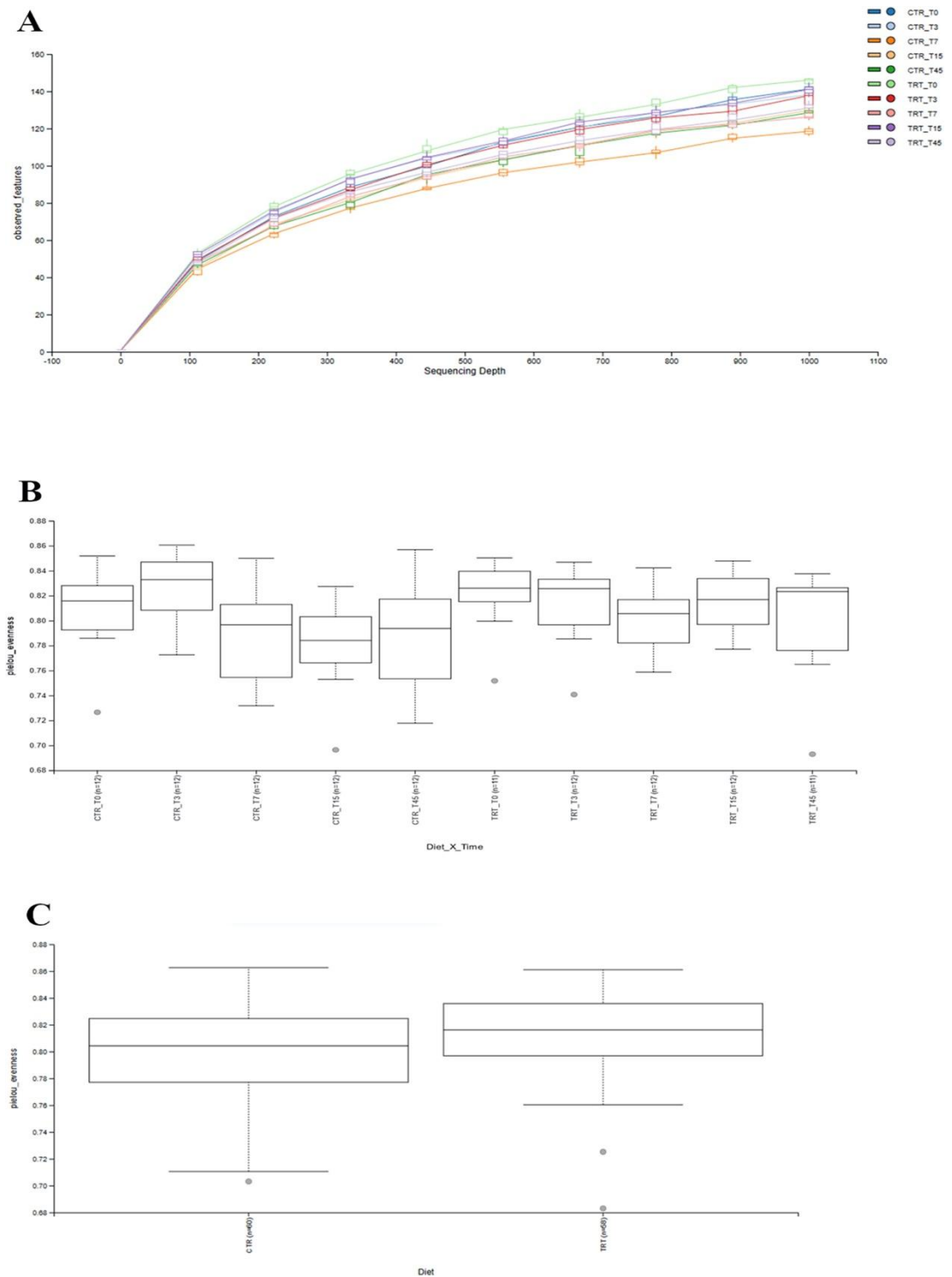


Figura 14 - Curva di rarefazione (A) ed *evenness* per l'interazione Dieta x Tempo (B) e per le diete (C) (Balouei et al., 2024).

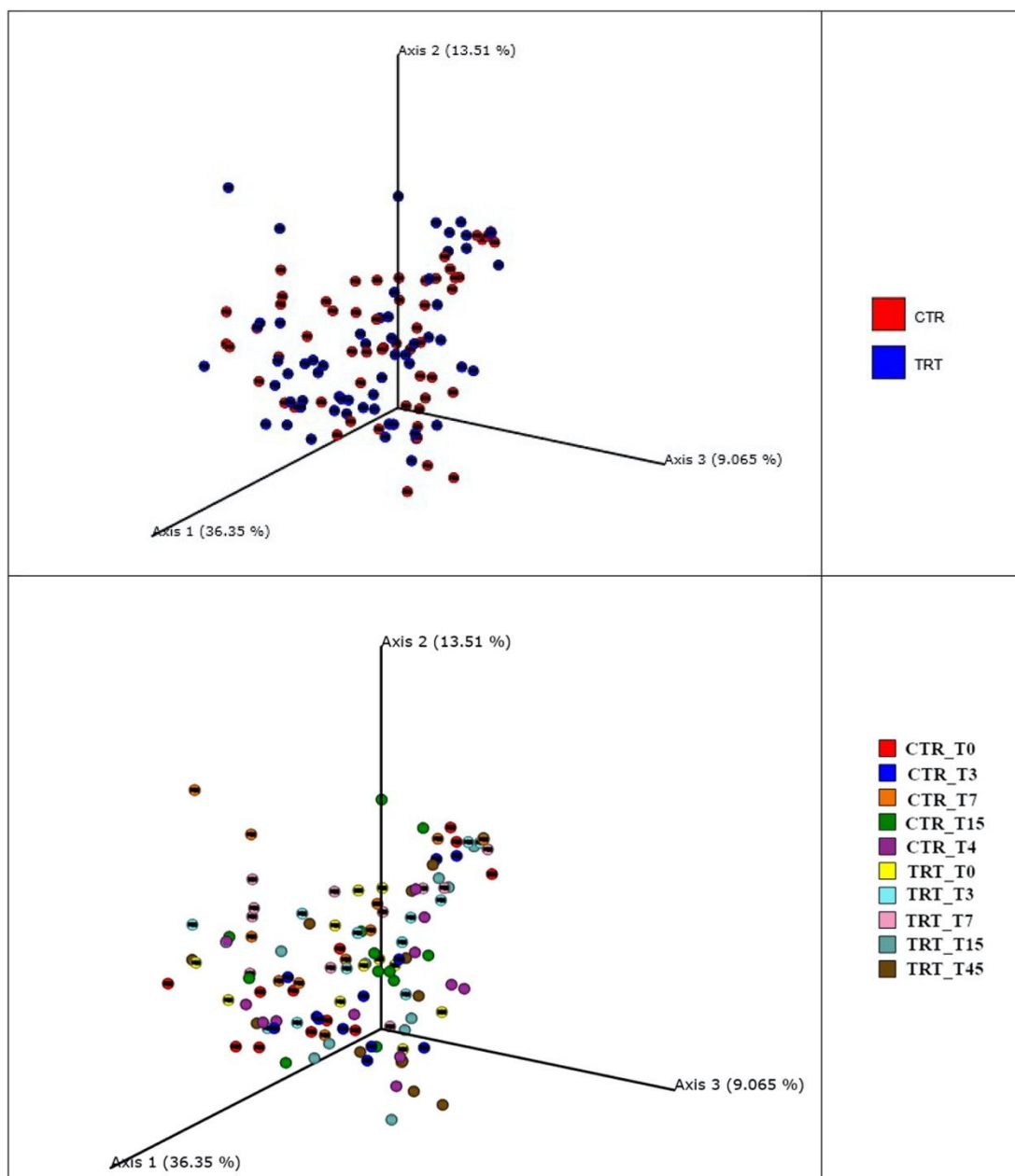


Figura 15 - Analisi delle componenti principali (PCoA) della β -diversity UniFrac del microbiota fecale, basata su informazioni filogenetiche: (A) in relazione al fattore Dieta \times Tempo (valore P PERMANOVA = 0,109); (B) in relazione al solo fattore Dieta (valore P PERMANOVA = 0,027) (Balouei et al., 2024).

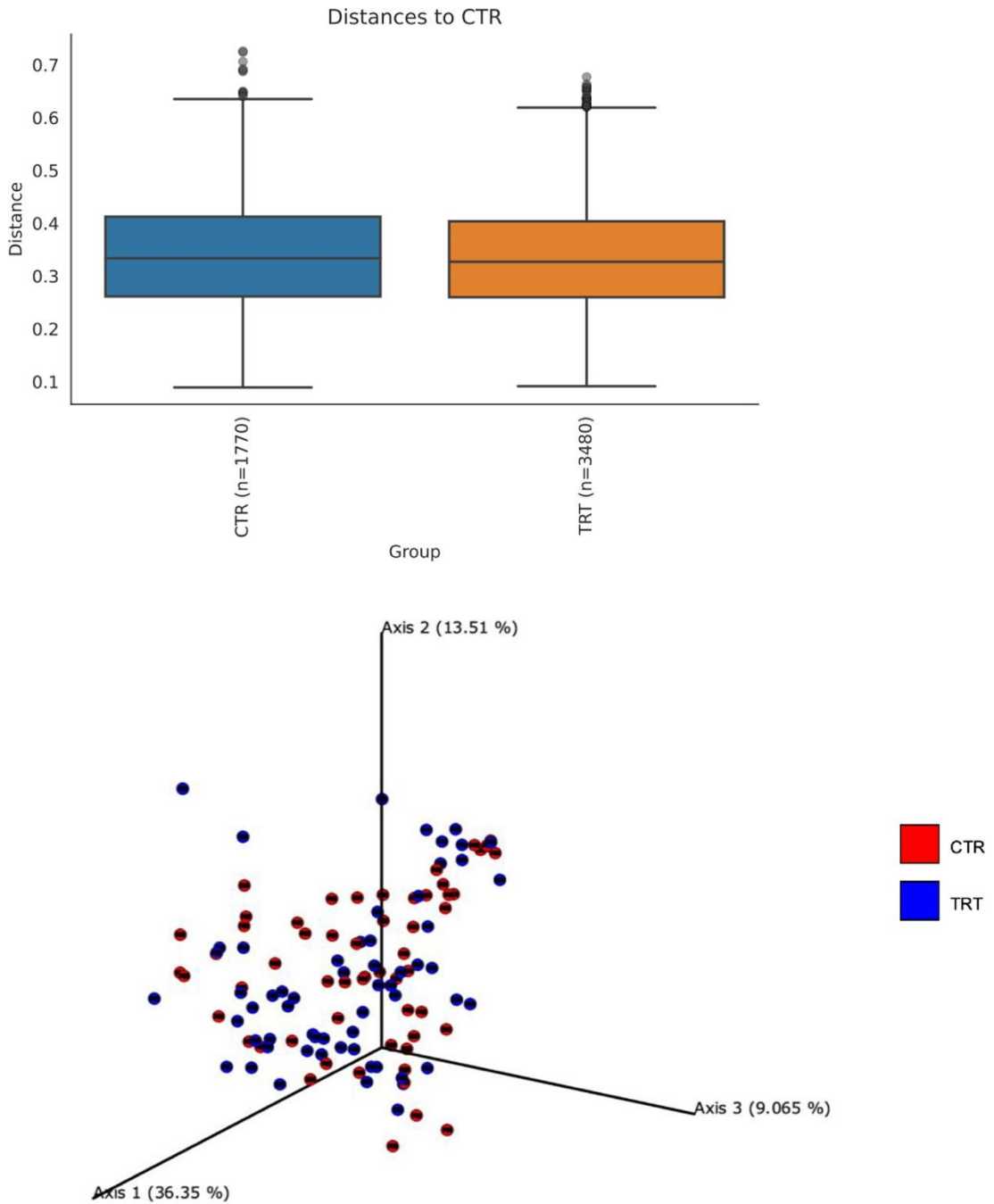


Figura 16 - Analisi delle componenti principali (PCoA) della β -diversity basata sulla distanza UniFrac del microbiota fecale: (A) distanza UniFrac non pesata, analisi in relazione al fattore Dieta (valore P PERMANOVA = 0,027); (B) distanza UniFrac pesata, analisi in relazione al fattore Dieta (Baloueï et al., 2024).

Tabella 6 - Taxa significativamente incluse nella funzione di classificazione dell'analisi discriminante (DA), con la dieta come variabile dipendente.

Phylum	Classi	Ordine	Famiglia	Genere / specie	P di F	P di Lambda
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	<0,0001	<0,0001
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	<i>Ruminococcus gnavus</i>	<0,0001	<0,0001
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides coprophilus</i>	<0,0001	<0,0001
Firmicutes	Erysipelotrichi	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	<i>Eubacterium</i>	0,000	<0,0001
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	-	0,000	<0,0001
Actinobacteria	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae	<i>Collinsella stercoris</i>	0,021	<0,0001
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides uniformis</i>	0,011	<0,0001
Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanosphaera</i>	0,026	<0,0001
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	-	0,028	<0,0001

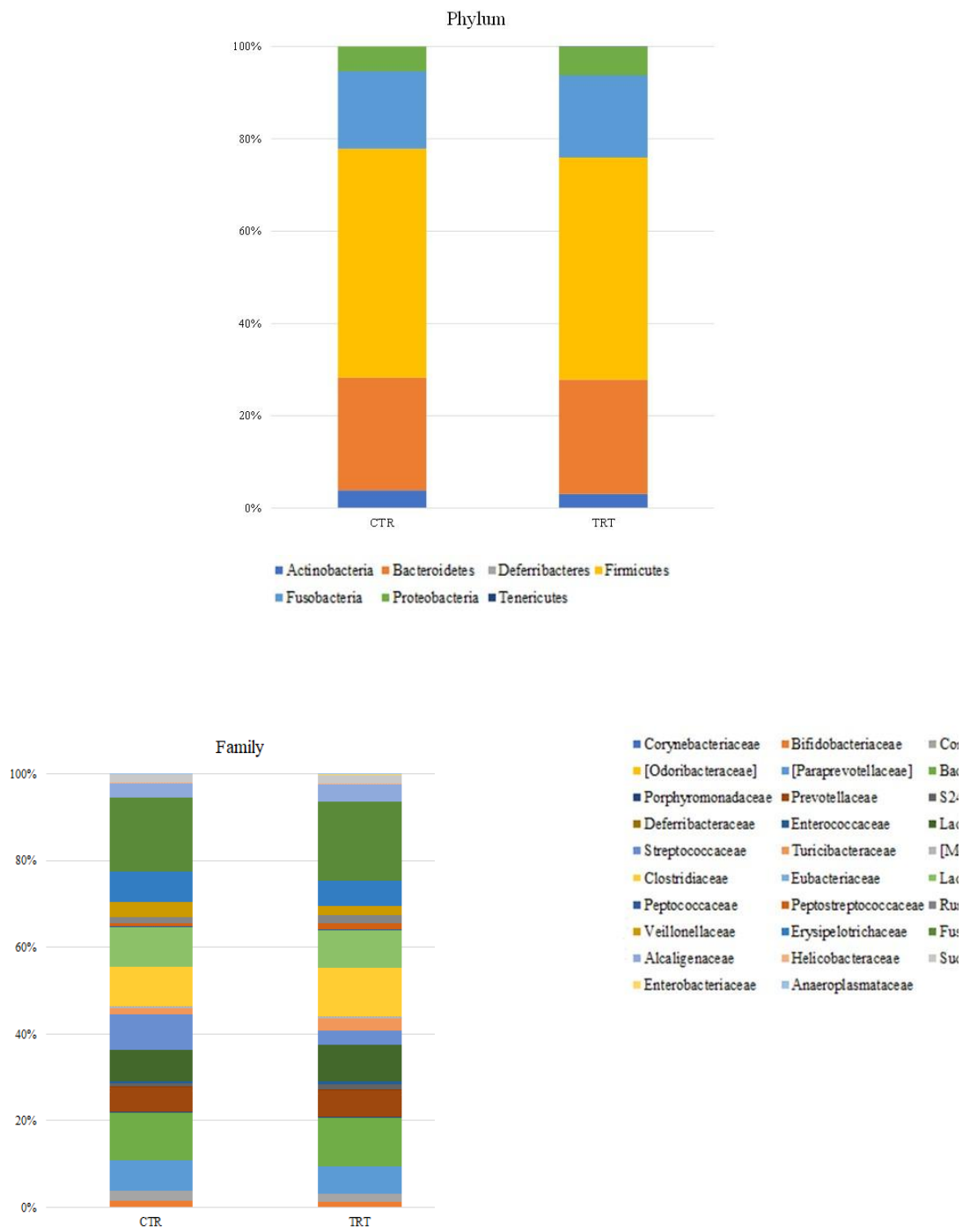


Figura 17 - Abbondanza relativa (asse Y) dei *phyla* e delle *famiglie* del microbiota fecale dei cani alimentati con la dieta PM (CTR) e con la dieta HFM (TRT) (Balouei et al., 2024).

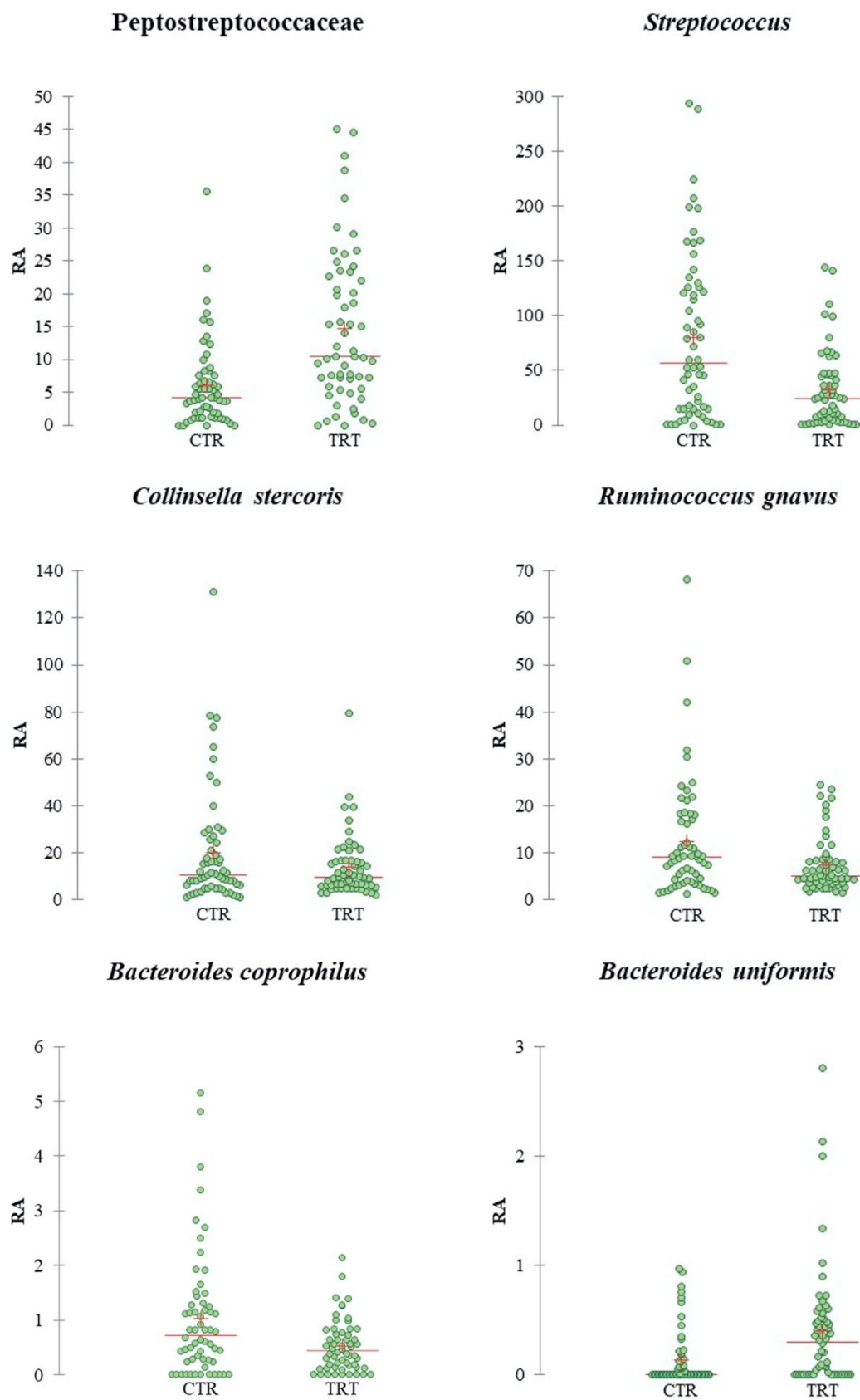


Figura 18 - Abbondanza relativa (RA) dei taxa inclusi nell'analisi discriminante che differivano in modo significativo tra le diete (Balouei et al., 2024).

4.3.2 Trial 2

I risultati relativi all'abbondanza relativa (RA) ai livelli tassonomici di phylum e famiglia sono presentati nella Figura 19 suddivisi per diete e tempi di campionamento. I dati indicano che i phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Fusobacteria* erano i più rappresentati nelle feci dei cani (Figura 19A). A livello tassonomico di famiglia, le più abbondanti risultavano le *Lachnospiraceae*, le *Fusobacteriaceae*, le *Prevotellaceae* e le *Bacteroidaceae* nel microbiota fecale dei cani (Figura 19B).

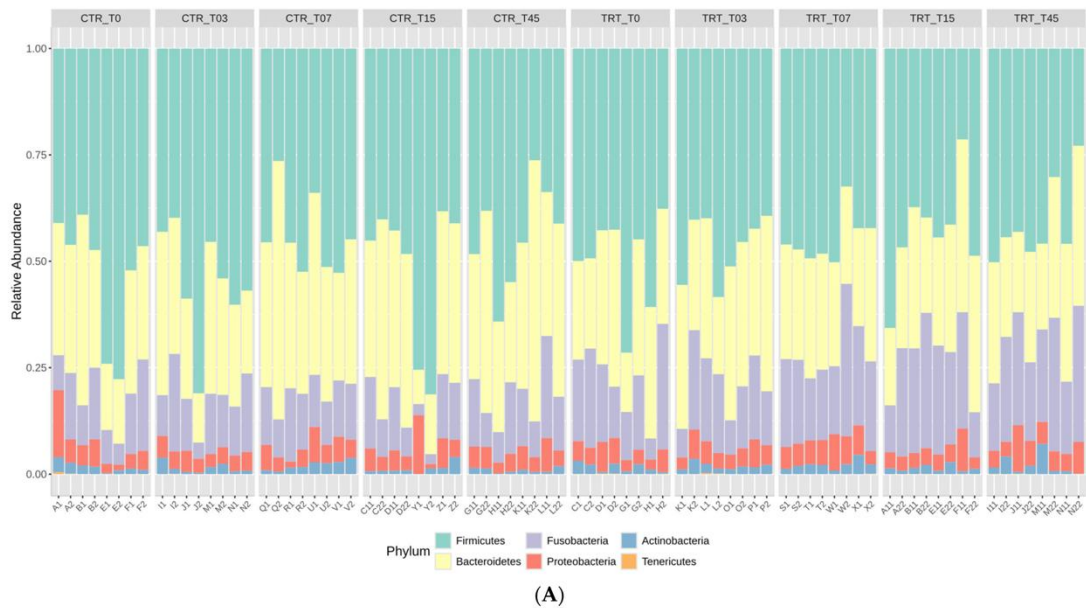


Figura 19A - Abbondanza relativa (RA) dei *phyla* (A) dei cani del gruppo CTR e dei cani del gruppo TRT ai tempi T0, T03, T07, T15 e T45 (Balouei et al., 2025).

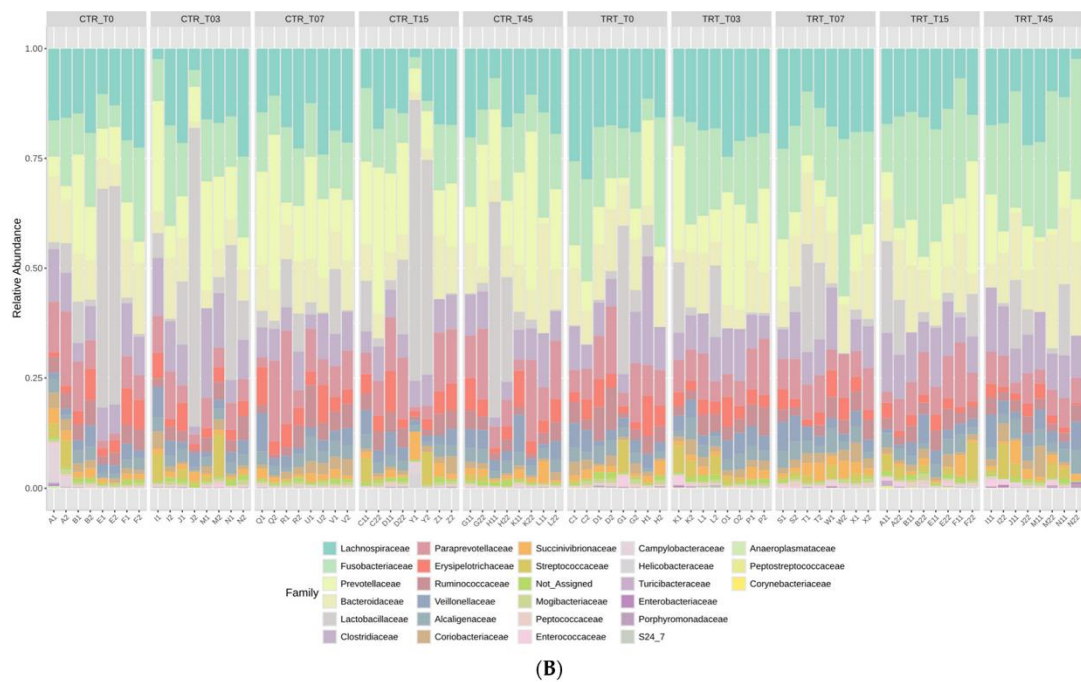


Figura 19B - Abbondanza relativa (RA) delle famiglie (B) dei cani del gruppo CTR e dei cani del gruppo TRT ai tempi T0, T03, T07, T15 e T45 (Balouei et al., 2025).

Per quanto riguarda l' α -diversity, il test di Mann–Whitney ha restituito un FDR $> 0,05$, indicando l'assenza di differenze statisticamente tra i due gruppi CTR e TRT (Figura 20A). Analogamente, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative né per l'interazione Dieta \times Tempo (Figura 20B), né in relazione al sesso (Figura 20C).

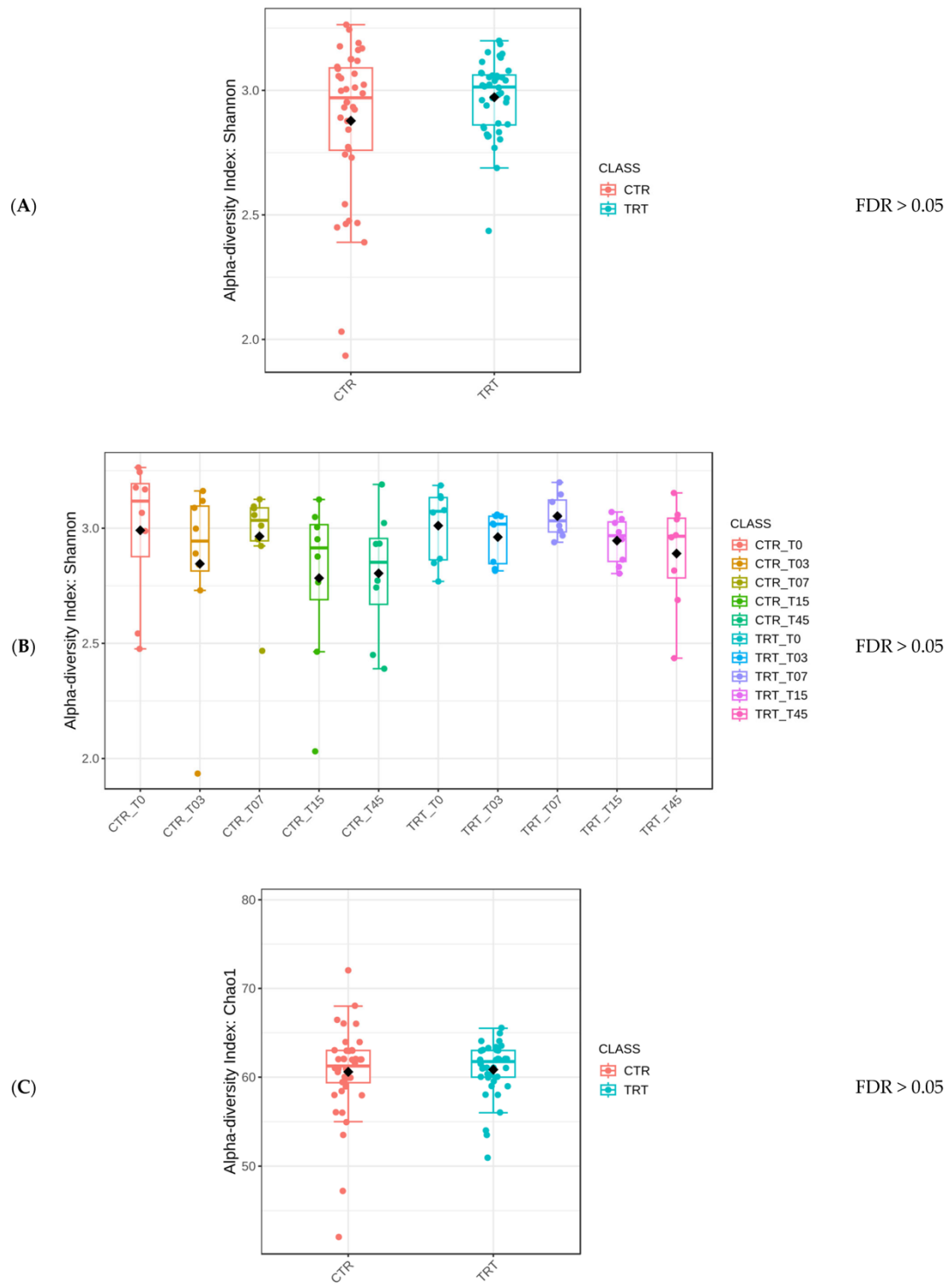


Figura 20 - α -diversità nei cani in relazione ai trattamenti dietetici (A), all'interazione Dieta \times Tempo (B) e al sesso (C) nei cani del gruppo CTR e nei cani del gruppo TRT ai tempi T0, T03, T07, T15 e T45 (Balouei et al., 2025).

I gruppi CTR e TRT sono stati analizzati per valutare le differenze nella β diversity, utilizzando la matrice di dissimilarità di Bray–Curtis, rappresentata tramite analisi delle componenti principali (PCoA) (Figura 21A). Il test PERMANOVA ha restituito un p-value di 0,001, indicando una differenza statisticamente significativa nell'indice di β diversity Bray–Curtis tra i due gruppi dietetici.

La Figura 21B mostra l'andamento dell'indice della β diversity Bray–Curtis nei cani del gruppo CTR e TRT durante tutto il periodo dello studio. I gruppi sono stati esaminati in diversi momenti: T0, T03, T07, T15 e T45. Anche in questo caso, il test PERMANOVA ha evidenziato un p-value di 0,009, indicando differenze significative nella β diversity tra le due diete nel corso del tempo. Tuttavia, confronti a coppie hanno mostrato differenze significative solo tra CTR_T07 e TRT_T07, e tra CTR_T07 e TRT_T45, suggerendo variazioni specifiche in quei punti temporali.

La Figura 21C riporta l'indice di β diversity nei cani maschi e femmine. Il test PERMANOVA ha rilevato una differenza significativa nell'indice di β diversity Bray–Curtis tra i sessi, con un p-value di 0,047.

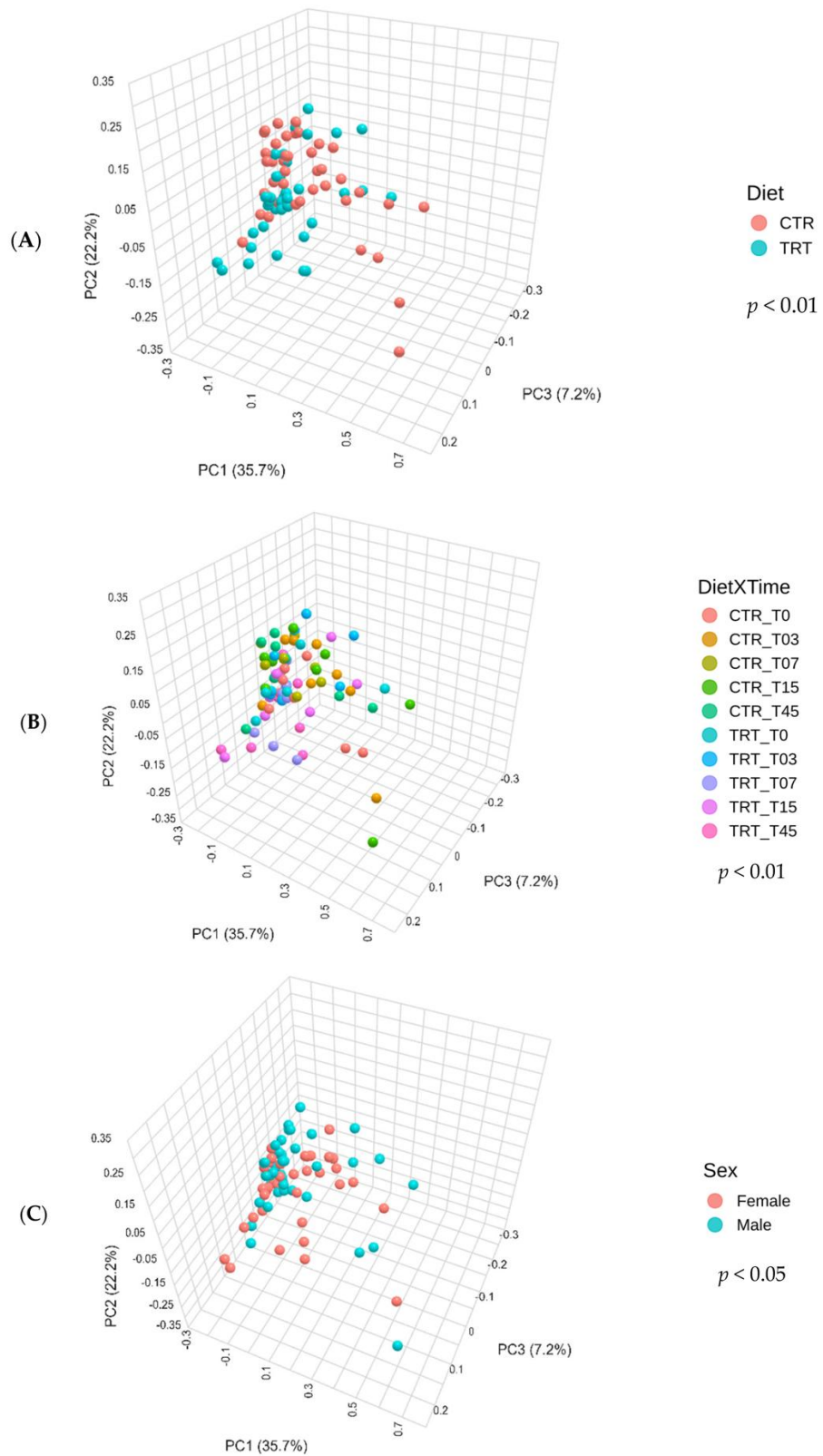


Figura 21 - β -diversità nei cani in relazione alla dieta (A), all'interazione Dieta \times Tempo (B) e al sesso (C) nei cani del gruppo CTR e nei cani del gruppo TRT ai tempi T0, T03, T07, T15 e T45 (Balouei et al., 2025).

L'analisi LEfSe ha evidenziato differenze significative nella composizione del microbiota fecale dei cani alimentati con le diete CTR e TRT (Figura 22). Nel gruppo CTR, risultavano significativamente più abbondanti l'ordine *Clostridiales* e quattro generi batterici. Al contrario, nel gruppo TRT sono risultate prevalenti quattro famiglie (*Fusobacteriaceae*, *Paraprevotellaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Peptostreptococcaceae*) e sette generi. L'analisi LEfSe delle caratteristiche significative identificate nell'interazione Dieta \times Tempo (Figura 23) ha mostrato che, al giorno T45, i cani del gruppo CTR presentavano un'abbondanza significativamente elevata della specie *Prevotella copri*. Al tempo T0, i cani del gruppo TRT mostravano un'abbondanza significativa del genere *Fusobacterium*. Nel gruppo TRT, il genere *Blautia* ha mostrato un incremento significativo dell'abbondanza a T03, mentre la famiglia *Fusobacteriaceae* lo ha mostrato a T07. Infine, i punteggi LDA dei generi risultati significativi erano superiori a 4.

L'analisi LEfSe ha ulteriormente messo in evidenza differenze significative nella composizione del microbiota fecale tra cani maschi e femmine (Figura 24). In totale, 23 taxa risultavano significativamente diversi tra i sessi, con 12 taxa più abbondanti nelle femmine (*Bacteroides*, *Anaerobiospirillum*, *Ruminococcaceae*, *Burkholderiales*, *Faecalibacterium*, *Clostridiales*, *Parabacteroides*, *Coprococcus*, *Bacteroidales*, *S24_7*, *Erysipelotrichaceae* e *Sarcina*), e 11 taxa più abbondanti nei maschi (*Peptostreptococcaceae*, *Clostridium celatum*, *Succinivibrionaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Turicibacter*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus*, *Ruminococcus gnavus*, *Blautia*, *Megamonas* e *Streptococcus luteciae*).

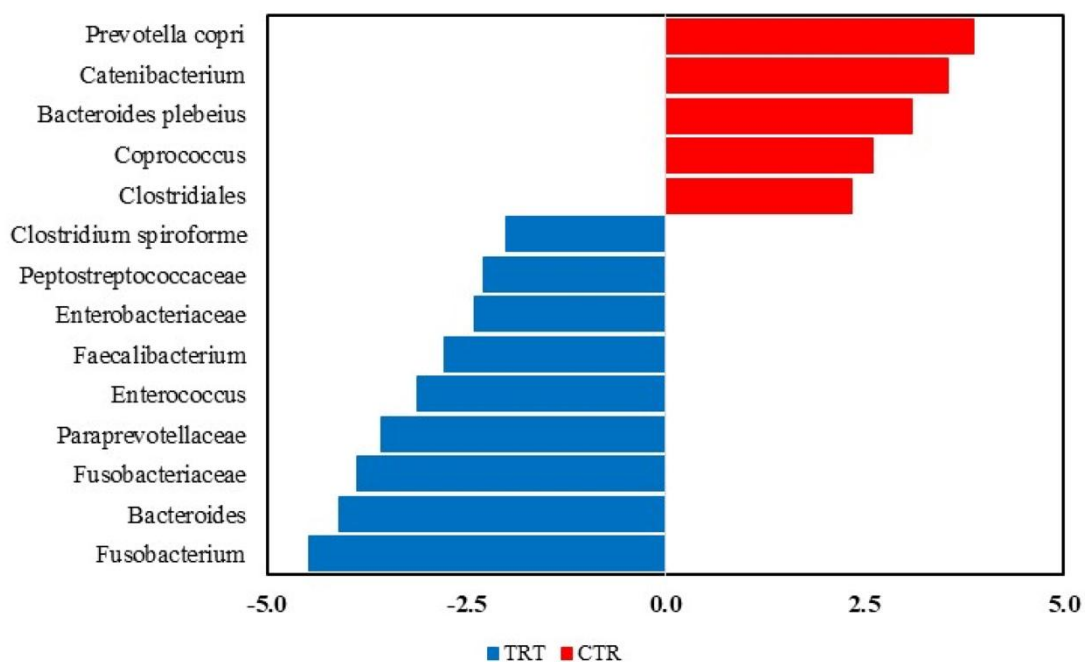


Figura 22 - Analisi Linear Discriminant Analysis Effect Size (LEfSe) dei Taxa che differivano significativamente tra i gruppi CTR e TRT (Balouei et al., 2025).

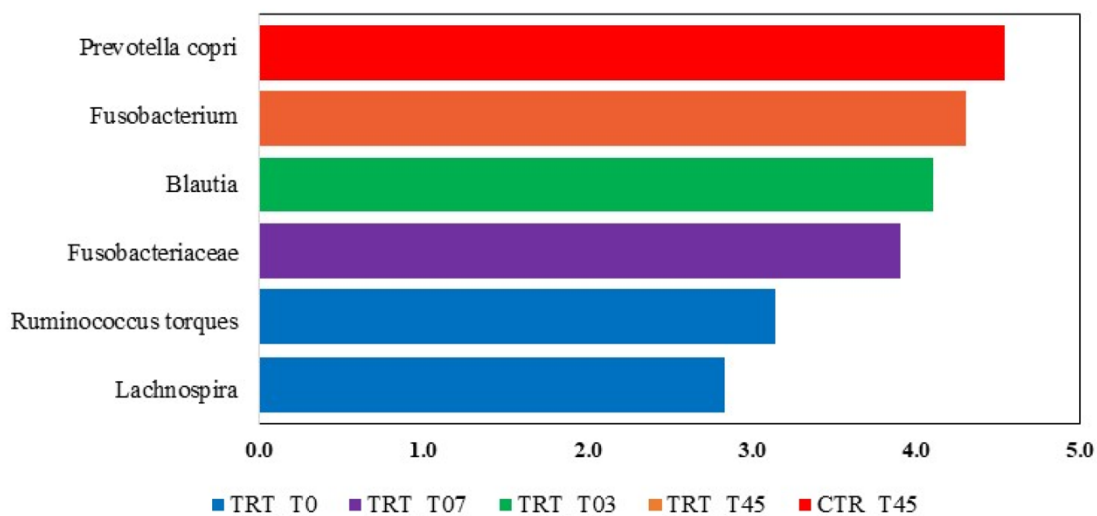


Figura 23 - Analisi Linear Discriminant Analysis Effect Size (LEfSe) dei Taxa che differivano significativamente tra i gruppi CTR e TRT ai tempi T0, T03, T07, T15 e T45 (Balouei et al., 2025).

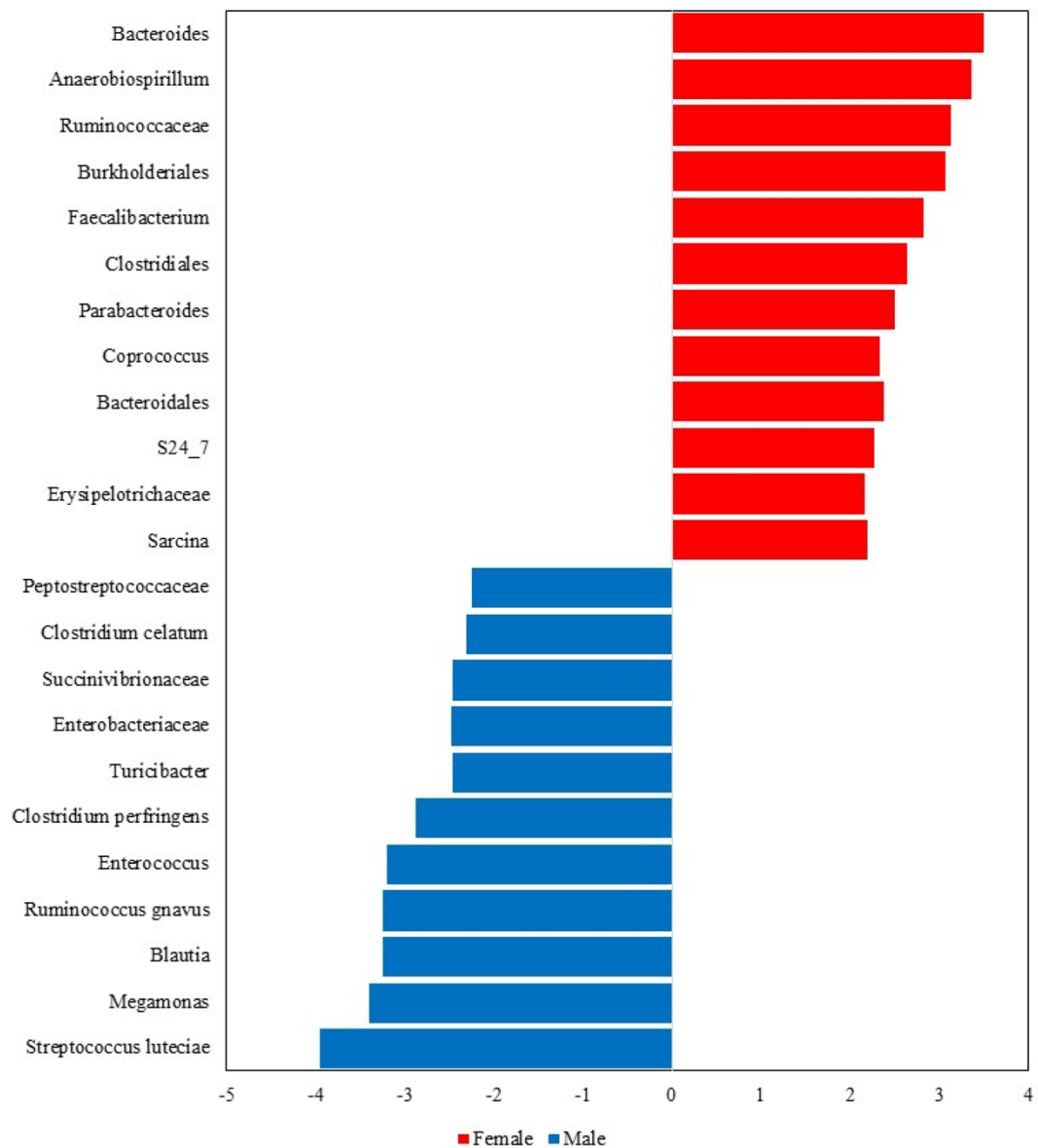


Figura 24 - Analisi Linear Discriminant Analysis Effect Size (LEfSe) dei Taxa che differivano significativamente tra i gruppi CTR e TRT per il sesso (Balouei et al., 2025).

4.4 DIGERIBILITA' APPARENTE

4.4.1 Trial 1

I risultati relativi alla digeribilità apparente totale a livello del tratto gastrointestinale di sostanza secca, proteine, grassi, amido e sostanza organica sono riportati nella Tabella 7. La dieta ha influenzato in modo significativo ($p < 0,05$) la digeribilità di proteine, grassi e amido. Inoltre, è stata osservata un'interazione

significativa tra Dieta e Tempo ($p < 0,05$) per la digeribilità della sostanza secca e degli altri nutrienti (Tabella 7). Tuttavia, non sono emerse differenze significative ($p > 0,05$) nella digeribilità dei nutrienti tra i gruppi CTR e TRT né all'inizio (T0) né al termine della prova (T45), ad eccezione della sostanza secca e dell'amido, che hanno mostrato una digeribilità significativamente più elevata ($p < 0,05$) nel gruppo TRT al tempo T45.

4.4.2 Trial 2

I risultati della digeribilità apparente a livello del tratto gastrointestinale di sostanza secca, proteine, grassi, amido e sostanza organica durante il periodo di prova sono riportati nella Tabella 8. Il Tempo ha avuto un effetto significativo ($p < 0,05$) sulla digeribilità di tutti i nutrienti. La Dieta, invece, ha influenzato in modo significativo ($p < 0,05$) solo la digeribilità di sostanza secca, amido e sostanza organica. Tuttavia, al termine della prova (T45), non sono state osservate differenze statisticamente significative tra le due diete per nessuno dei nutrienti considerati. Inoltre, non è stata rilevata alcuna interazione significativa tra Dieta e Tempo ($p > 0,05$) per la digeribilità dei nutrienti (Tabella 8).

Tabella 7 – Coefficienti di digeribilità apparente (%)¹ dei nutrienti durante la seconda prova.

	Gruppi ²	Tempo ³					p-value ⁴		
		T0	T3	T7	T15	T45	Dieta	Tempo	D x T
s.s	CTR	85,9cd	86,3d	79,5a	86,0cd	83,1b	0,356	< 0,001	< 0,001
	SE	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02			
	TRT	84,1bc	86,7cd	81,6ab	86,5cd	86,1cd			
	SE	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02			
PG	CTR	79,4bc	81,7c	72,3a	80,7c	75,4ab	0,007	< 0,001	0,041
	SE	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03			
	TRT	75,8ab	80,4c	71,3a	79,2bc	77,8bc			
	SE	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03			
Grassi	CTR	94,0bcd	95,3cd	93,5abc	95,7d	95,4cd	0,030	< 0,001	0,041
	SE	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01			
	TRT	93,0ab	95,7d	90,8a	95,7cd	96,0d			
	SE	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01			
Amido	CTR	95,3bcd	95,5cd	93,4a	94,9abc	94,2ab	< 0,001	< 0,001	0,003
	SE	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01			
	TRT	95,3bcd	96,3d	95,0bc	96,3d	96,0cd			
	SE	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01			
OM	CTR	88,7abc	90,3c	87,2a	89,9bc	87,7ab	0,143	< 0,001	0,040
	SE	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02			
	TRT	87,2a	90,3c	87,3a	89,3abc	89,40abc			
	SE	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01			

SS: Sostanza secca; PG: Proteine grezze; OM: Sostanza organica

Digeribilità apparente (%): [Nutrient intake (g/d) – Fecal nutrient output (g/d) / Nutrient intake (g/d)] x 100.

¹ I valori sono espressi come medie ai minimi quadrati (LSM) ± errore standard (SE).

² Gruppi: Gruppo CTR, cani alimentati con dieta PM (dieta contenente farina di pollo); Gruppo TRT, cani alimentati con dieta HFM (dieta contenente farina di piume idrolizzate).

³ Tempo: Giorni di raccolta delle feci (T0-T45).

⁴a-d (p < 0,05).

Tabella 8 – Coefficienti di digeribilità apparente (%)¹ dei nutrienti durante la seconda prova.

	Gruppi ²	Tempo ³					p-value ⁴		
		T0	T3	T7	T15	T45	Dieta	Tempo	D x T
s.s.	CTR	86,10abc	84,40a	85,70ab	84,90a	85,00a	<0,001	0,005	0,090
	SE	0,87	0,93	0,89	0,94	0,94			
	TRT	88,20cd	87,70bcd	88,60d	85,10ab	86,40abcd			
	SE	0,80	0,82	0,78	0,94	0,90			
PG	CTR	80,00b	77,10ab	78,30ab	77,70ab	77,70ab	0,391	0,002	0,180
	SE	0,81	0,82	0,84	0,89	0,89			
	TRT	80,60b	79,20ab	79,90ab	76,90ab	76,10a			
	SE	0,84	0,87	0,86	0,95	0,97			
Grassi	CTR	93,50a	93,70a	93,80a	93,80a	95,40b	0,081	<0,001	0,436
	SE	0,39	0,37	0,38	0,40	0,33			
	TRT	94,20ab	94,70ab	93,80a	93,80a	95,40b			
	SE	0,38	0,36	0,40	0,41	0,35			
Amido	CTR	95,70abc	95,00a	95,30ab	95,10ab	95,30ab	<0,001	0,045	0,236
	SE	0,29	0,32	0,31	0,33	0,33			
	TRT	96,50cd	96,20bcd	96,70d	95,70abcd	95,60abcd			
	SE	0,27	0,30	0,25	0,31	0,33			
OM	CTR	88,50abc	88,40ab	88,90bc	86,80a	88,80abc	<0,001	<0,001	0,466
	SE	0,67	0,66	0,66	0,76	0,68			
	TRT	90,00bcd	90,40cd	91,10d	88,30ab	89,50bcd			
	SE	0,63	0,61	0,58	0,72	0,67			

SS: Sostanza secca; PG: Proteine grezze; OM: Sostanza organica

Digeribilità apparente (%): [Nutrient intake (g/d) – Fecal nutrient output (g/d) / Nutrient intake (g/d)] x 100.

¹ I valori sono espressi come medie ai minimi quadrati (LSM) ± errore standard (SE).

² Gruppi: Gruppo CTR, cani alimentati con dieta PM (dieta contenente farina di pollo); Gruppo TRT, cani alimentati con dieta HFM (dieta contenente farina di piume idrolizzate).

³ Tempo: Giorni di raccolta delle feci (T0-T45).

⁴a-d (p < 0,05).

4.5 PRODOTTI DELLA FERMENTAZIONE

4.5.1 Acidi Grassi Volatili

4.5.1.1 Trial 1

I contenuti di acetato, propionato, butirrato, isobutirrato, degli SCFA totali e della somma degli acidi organici (SOA) nei campioni fecali sono riportati nella Tabella 9 in funzione della Dieta, del Tempo e dell'interazione D x T. Durante il trial 1, la dieta ha avuto un effetto significativo ($p < 0,001$) sul contenuto degli acidi organici fecali. L'interazione tra Dieta e Tempo ha influenzato in modo significativo ($p < 0,05$) le concentrazioni di butirrato e isobutirrato. All'inizio del trial (T0), le concentrazioni di propionato e butirrato sono risultate significativamente più elevate ($p < 0,05$) nelle feci dei cani del gruppo CTR rispetto a quelle del gruppo TRT. Al contrario, le concentrazioni di isobutirrato, SCFA totali e SOA sono apparse significativamente più alte ($p < 0,05$) nel gruppo TRT rispetto al gruppo CTR. Tuttavia, alcune di queste differenze si sono ridotte alla fine del trial (T45), poiché le concentrazioni di isobutirrato, SCFA totali e SOA non hanno mostrato differenze significative ($p > 0,05$) tra i gruppi.

4.5.1.2 Trial 2

I contenuti di acetato, propionato, butirrato, isobutirrato, degli SCFA totali e della somma degli acidi organici (SOA) nei campioni fecali sono riportati nella Tabella 10 in funzione della Dieta, del Tempo e dell'interazione D x T. Durante il trial 2, Dieta, Tempo e la loro interazione hanno avuto un effetto significativo sul contenuto di acidi organici nelle feci dei cani. In particolare, le concentrazioni di acetato e butirrato sono risultate significativamente più elevate nelle feci del gruppo TRT rispetto al gruppo CTR per l'intera durata della prova (da T0 a T45). Al contrario, nello stesso intervallo temporale, le concentrazioni di propionato e isobutirrato sono risultate significativamente più alte nelle feci del gruppo CTR rispetto al TRT.

Tabella 9 – Concentrazione degli acidi organici fecali ($\mu\text{mol/g}$ di feci fresche)¹ durante la prima prova.

	Gruppi ²	Tempo ³					p-value ⁴		
		T0	T3	T7	T15	T45	Dieta	Tempo	DxT
Acetato	CTR	132a	134a	134a	132a	131a	< 0,001	0,694	0,981
	SEM	1,79	1,67	1,73	1,86	1,86			
	TRT	159b	159b	159b	158b	157b			
	SEM	1,76	1,87	1,87	1,95	1,95			
Propionato	CTR	36,80de	38,50e	33,50cd	30,60abc	33,10cd	< 0,001	< 0,001	0,1298
	SEM	1,11	1,03	1,07	1,15	1,15			
	TRT	30,30abc	32,50bcd	30,90abc	27,30ab	25,50a			
	SE	1,09	1,16	1,16	1,21	1,21			
Butirrato	CTR	21,40c	26,60e	29,90fg	29,90fg	31,60g	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	SEM	0,44	0,41	0,42	0,45	0,45			
	TRT	13,30a	19,00b	22,50cd	29,20f	23,80d			
	SE	0,43	0,46	0,46	0,47	0,47			
Isobutirrato	CTR	7,99a	9,45b	9,90bc	11,11cd	11,36de	< 0,001	< 0,001	0,014
	SEM	0,30	0,28	0,29	0,31	0,31			
	TRT	11,00cd	12,23de	12,03de	12,68e	12,59e			
	SE	0,29	0,31	0,31	0,33	0,33			
SCFA	CTR	191a	199abc	197abc	193ab	196abc	< 0,001	0,001	0,091
	SEM	2,31	2,15	2,22	2,40	2,40			
	TRT	202bcd	210de	212de	215e	206cde			
	SEM	2,26	2,41	2,41	2,51	2,51			
SOA	CTR	199a	209abc	207ab	204ab	207abc	< 0,001	< 0,001	0,142
	SEM	2,37	2,21	2,28	2,47	2,47			
	TRT	213bcd	222de	224e	228e	219cde			
	SEM	2,32	2,48	2,48	2,58	2,58			

SCFA: somma degli acidi grassi a catena corta (C2:0 + C3:0 + C4:0); SOA: somma degli acidi organici (C2:0 + C3:0 + C4:0 + isoC4:0).

¹I valori sono espressi come medie dei minimi quadrati (LSM) \pm errore standard della media (SEM).

² Gruppi: Gruppo CTR, cani alimentati con dieta PM (dieta contenente farina di pollo); Gruppo TRT, cani alimentati con dieta HFM (dieta contenente farina di piume idrolizzate).

³ Tempo: Giorni di raccolta delle feci (T0-T45).

⁴ a-g p < 0,05.

Tabella 10 – Concentrazione degli acidi organici fecali ($\mu\text{mol/g}$ di feci fresche)¹ durante la seconda prova.

	Gruppi ²	Tempo ³					p-value ⁴		
		T0	T3	T7	T15	T45	Dieta	Tempo	D x T
Acetato	CTR	135ab	137b	136ab	135ab	133a	<0,001	<0,001	0,079
	SEM	3,89	4,06	3,98	3,95	3,84			
	TRT	171c	177d	169c	170c	169c			
	SE	6,26	6,76	6,14	6,18	6,15			
Propionato	CTR	38,80ef	41,20f	36,50de	33,80c	37,60e	<0,001	<0,001	<0,001
	SEM	1,93	2,15	1,71	1,49	1,82			
	TRT	30,90b	34,50cd	31,10b	27,90a	26,00a			
	SE	1,27	1,57	1,28	1,04	0,93			
Butirrato	CTR	21,80c	28,40f	31,20g	31,80gh	32,80h	<0,001	<0,001	<0,001
	SEM	0,84	1,42	1,71	1,78	1,88			
	TRT	14,10a	20,30b	23,30d	29,20f	26,30e			
	SEM	0,36	0,73	0,96	1,50	1,22			
Isobutirrato	CTR	8,72a	9,66b	9,85b	11,10c	11,52c	<0,001	<0,001	<0,001
	SEM	0,31	0,37	0,38	0,48	0,52			
	TRT	12,93d	14,33e	13,74e	13,62de	13,86e			
	SEM	0,65	0,80	0,74	0,72	0,75			
SCFA	CTR	196 a	207,00c	204bc	201b	204bc	<0,001	<0,001	<0,001
	SEM	6,56	7,38	7,15	6,96	7,17			
	TRT	216d	231,00f	223e	227ef	221e			
	SEM	8,02	9,29	8,63	8,88	8,46			
SOA	CTR	204a	217,00c	213bc	212b	215bc	<0,001	<0,001	<0,001
	SEM	6,83	7,72	7,50	7,40	7,64			
	TRT	229d	246,00f	237e	240ef	235e			
	SEM	8,60	10,00	9,28	9,52	9,12			

SCFA: somma degli acidi grassi a catena corta (C2:0 + C3:0 + C4:0); SOA: somma degli acidi organici (C2:0 + C3:0 + C4:0 + isoC4:0).

¹I valori sono espressi come medie dei minimi quadrati (LSM) \pm errore standard della media (SEM).

²Gruppi: Gruppo CTR, cani alimentati con dieta PM (dieta contenente farina di pollo); Gruppo TRT, cani alimentati con dieta HFM (dieta contenente farina di piume idrolizzate).

³Tempo: Giorni di raccolta delle feci (T0-T45).

⁴a-h p < 0,05.

4.5.2 Ammine biogene

4.5.2.1 Trial 1

La Tabella 11 riporta il contenuto di ammine biogene nei campioni fecali in funzione della Dieta, del Tempo e dell'interazione D x T. I risultati relativi a istamina, tiramina e spermidina non sono stati riportati poiché le loro concentrazioni sono risultate inferiori al limite di quantificazione (LOQ: 0,001 mg/g). Le ammine biogene più abbondanti nei campioni sono risultate essere putrescina, cadaverina e spermina.

La Dieta e l'interazione tra Dieta e Tempo hanno avuto un effetto significativo ($P < 0,001$) sulle singole ammine biogene rilevate e sulla loro somma. All'inizio del trial (T0), le concentrazioni di putrescina e cadaverina, così come la somma delle ammine biogene, sono risultate significativamente più elevate ($p < 0,05$) nelle feci dei cani del gruppo TRT rispetto a quelle del gruppo CTR. Al contrario, le concentrazioni di spermina sono apparse significativamente più alte ($p < 0,05$) nel gruppo CTR rispetto al gruppo TRT. Alla fine del trial (T45), putrescina e cadaverina hanno mantenuto lo stesso andamento, mostrando differenze significative ($p < 0,05$) tra i gruppi. Tuttavia, a T45 cadaverina e la somma totale delle ammine biogene non hanno mostrato differenze significative ($p > 0,05$) tra i gruppi CTR e TRT.

4.5.2.2 Trial 2

La Tabella 12 riporta il contenuto di ammine biogene nei campioni fecali in funzione della Dieta, del Tempo e dell'interazione D x T. I risultati relativi a istamina, tiramina e spermidina non sono stati riportati poiché le loro concentrazioni sono risultate inferiori al limite di quantificazione (LOQ: 0,001 mg/g). Le ammine biogene più abbondanti nei campioni sono risultate essere putrescina, cadaverina e spermina.

La Dieta, il Tempo e la loro interazione hanno influenzato in modo significativo ($p < 0,001$) tutte le ammine biogene analizzate, nonché la somma totale delle ammine biogene. In particolare, le concentrazioni di putrescina e cadaverina sono risultate significativamente ($p < 0,001$) più elevate nel gruppo TRT per l'intera durata della prova. Al contrario, la spermina è risultata significativamente ($p < 0,001$) più alta nel gruppo CTR in tutti i tempi di campionamento, ad eccezione dei giorni 7 e 15 (T7 e T15), quando si è osservata un'inversione dell'andamento, con concentrazioni più elevate ($p < 0,001$) nel gruppo TRT.

Tabella 11 – Concentrazione delle ammine biogene fecali (mg/g di feci fresche)¹ durante la prima prova.

	Gruppi ²	Tempo ³					p-value ⁴		
		T0	T3	T7	T15	T45	Dieta	Tempo	D x T
Triptamina	CTR	0,002ab	0,007ef	0,003cd	0,005de	0,002a	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	SEM	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000			
	TRT	0,003bc	0,006ef	0,009f	0,008ef	0,002ab			
	SEM	0,000	0,001	0,001	0,001	0,000			
Feniletilamina	CTR	0,002b	0,004c	0,006c	0,006c	0,001a	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	SEM	0,000	0,000	0,006	0,001	0,000			
	TRT	0,002b	0,010d	0,002b	0,010d	0,001a			
	SEM	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000			
Putrescina	CTR	0,078bc	0,077bc	0,067a	0,072ab	0,074ab	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	SEM	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002			
	TRT	0,107d	0,112d	0,107d	0,118d	0,086c			
	SEM	0,003	0,003	0,003	0,004	0,003			
Cadaverina	CTR	0,038a	0,045b	0,053c	0,056c	0,065d	< 0,001	0,034	< 0,001
	SEM	0,001	0,001	0,002	0,002	0,002			
	TRT	0,089e	0,087e	0,087e	0,084e	0,072d			
	SEM	0,003	0,029	0,003	0,003	0,005			
Spermina	CTR	0,111e	0,147f	0,130ef	0,105e	0,034b	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	SEM	0,006	0,008	0,007	0,006	0,002			
	TRT	0,057c	0,078d	0,143f	0,109e	0,026a			
	SEM	0,003	0,004	0,008	0,006	0,001			
Somma delle ammine biogene	CTR	0,231b	0,281de	0,259cd	0,243bc	0,175a	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	SEM	0,005	0,006	0,005	0,005	0,004			
	TRT	0,259cd	0,292e	0,349f	0,329f	0,187a			
	SEM	0,005	0,007	0,008	0,008	0,004			

¹I valori sono espressi come medie dei minimi quadrati (LSM) ± errore standard della media (SEM).

² Gruppi: Gruppo CTR, cani alimentati con dieta PM (dieta contenente farina di pollo); Gruppo TRT, cani alimentati con dieta HFM (dieta contenente farina di piume idrolizzate).

³ Tempo: Giorni di raccolta delle feci (T0-T45).

⁴ a-f p < 0,05.

Tabella 12 – Concentrazione delle ammine biogene fecali (mg/g di feci fresche)¹ durante la seconda prova.

	Gruppi ²	Tempo ³					p-value ⁴		
		T0	T3	T7	T15	T45	Dieta	Tempo	D x T
Tryptamina	CTR	0,002a	0,005e	0,005de	0,006e	0,003ab	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	SEM	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			
	TRT	0,003ab	0,004cd	0,010f	0,009f	0,003bc			
	SEM	0	0	0,002	0,001	0			
Feniletilamina	CTR	0,003b	0,004d	0,004cd	0,005d	0,002a	< 0,001	< 0,001	0,002
	SEM	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			
	TRT	0,003bc	0,008e	0,005d	0,011e	0,003b			
	SEM	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000			
Putrescina	CTR	0,082bc	0,084c	0,069a	0,077b	0,075b	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	SEM	0,004	0,004	0,003	0,003	0,003			
	TRT	0,113d	0,116de	0,124e	0,123de	0,089c			
	SEM	0,007	0,007	0,008	0,008	0,004			
Cadaverina	CTR	0,037a	0,045b	0,055c	0,057c	0,068d	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	SEM	0,001	0,002	0,003	0,003	0,004			
	TRT	0,093f	0,093f	0,094f	0,089f	0,077e			
	SEM	0,007	0,007	0,007	0,006	0,005			
Spermina	CTR	0,126ef	0,152h	0,137fg	0,119e	0,037b	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	SEM	0,008	0,012	0,009	0,007	0,001			
	TRT	0,058c	0,091d	0,144gh	0,126ef	0,029a			
	SEM	0,002	0,005	0,011	0,008	0,001			
Somma delle ammine biogene	CTR	0,249c	0,291e	0,269d	0,264cd	0,184a	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	SEM	0,014	0,018	0,016	0,015	0,008			
	TRT	0,269cd	0,311e	0,360f	0,355f	0,201b			
	SEM	0,016	0,021	0,028	0,027	0,009			

¹I valori sono espressi come medie dei minimi quadrati (LSM) ± errore standard della media (SEM).

² Gruppi: Gruppo CTR, cani alimentati con dieta PM (dieta contenente farina di pollo); Gruppo TRT, cani alimentati con dieta HFM (dieta contenente farina di piume idrolizzate).

³ Tempo: Giorni di raccolta delle feci (T0-T45).

⁴ a-f p < 0,05.

5. DISCUSSIONI

5.1 PERFORMANCE ZOOTECHNICHE

5.1.1 *Trial 1*

I risultati relativi al peso corporeo risultati sovrapponibili tra i cani alimentati con o senza inclusione di farina di piume idrolizzate sono in accordo con quanto riportato da El-Wahab e collaboratori (2022) su femmine adulte di Beagle alimentate con diete contenenti tre livelli di inclusione di farina di piume idrolizzate (5%, 10% e 20%). Tuttavia, El-Wahab et al. (2022) hanno osservato un aumento del punteggio fecale con di inclusione del 10% e 20% di farina di piume. Questi risultati sono in contrasto con quanto osservato nel nostro studio, in cui i punteggi fecali non sono stati influenzati dai trattamenti alimentari (TRT vs CTR); inoltre, l'inclusione del 7% di farina di piume di pollo idrolizzate ha prodotto feci ben formate per tutta la durata della prova (da T0 a T45), con valori compresi tra 2,13 e 2,75 su una scala a 5 punti. Tali risultati sono tuttavia paragonabili a quelli di Pacheco et al. (2016), i quali hanno osservato feci ben formate in Beagle adulti alimentati con diete contenenti il 7,5% e il 15% di farina di piume idrolizzate. I risultati contraddittori degli studi citati potrebbero essere attribuiti a diversi fattori che influenzano la qualità delle feci, tra cui la digeribilità dei nutrienti, l'assunzione di alimento e la composizione del microbiota intestinale (Wakshlag et al., 2011; Do et al., 2021).

Per quanto riguarda le performance, i risultati sovrapponibili tra i due trattamenti alimentari ottenuti in questo studio indicano che la farina di piume idrolizzate può essere inclusa nella dieta del cane fino al 7% senza influenzare le prestazioni dell'animale (BW, BCS, MCS) (Apple et al., 2003; Campos et al., 2017), suggerendo che la farina di piume idrolizzata può costituire una valida fonte proteica da impiegare negli alimenti per animali da compagnia.

Prove condotte su specie animali di interesse zootecnico suggeriscono che l'inclusione della farina di piume nella dieta non ha effetti negativi sulle performance. Ad esempio, la sostituzione della farina di estrazione di soia con il 9% di farina di piume nella dieta di suini non ha influenzato le prestazioni degli animali (Chiba et al., 1995). Allo stesso modo, alcuni autori non hanno osservato differenze significative nelle performance dei suini alimentati con diete contenenti dal 2% all'8% di farina di piume, sebbene ad un livello di sostituzione del 10% si sia osservata una riduzione

delle prestazioni (van Heugten & van Kempen, 2002). Tuttavia, Chiba et al. (1995) hanno riportato che le diete per suini contenenti fino al 15% di piume di pollo, in sostituzione della farina di estrazione di soia e opportunamente supplementate con isolisina, garantivano performance comparabili.

Per quanto riguarda i polli da carne, è stato evidenziato che le performance rimangono stabili fino a un'inclusione del 4% di farina di piume, mentre si osserva un peggioramento a più alti livelli di inclusione compresi tra il 5% e l'8% (Moran et al., 1966; Luong & Payne, 1977; MacAlpine & Payne, 1977). Inoltre, Eissler e Firman (1996) hanno riportato che diete per tacchini con livelli di sostituzione fino al 6%, supplementate con isolisina, non influenzano significativamente le performance.

Studi recenti hanno anche analizzato gli effetti della sostituzione della farina di pesce con livelli crescenti di farina di piume idrolizzate (5%, 7,5% e 12,5%) sugli indici di accrescimento di spigole (*Dicentrarchus labrax*) (Campos et al., 2017), evidenziando l'assenza di differenze significative ($p > 0,05$) nel peso vivo finale e nelle performance di crescita tra i gruppi sperimentali.

La letteratura (Baker et al., 1981; Cabel et al., 1987; Chiba et al., 1995; Cupo & Cartwright, 1991; Campos et al., 2017) ha dimostrato che l'integrazione con aminoacidi sintetici permette l'inclusione fino al 10% di farina di piume nelle diete per animali da reddito senza compromettere né l'aumento di peso né l'efficienza alimentare. Sulla base di queste osservazioni, le performance comparabili osservate in questo studio potrebbero essere attribuite al profilo amminoacidico simile delle due diete, in particolare per quanto riguarda il contenuto di lisina (HFM: 1,91 g/100 g t.q.; PM: 1,82 g/100 g t.q.).

5.1.2 Trial 2

I risultati sovrapponibili tra le diete sperimentali relativi a BW, BCS e MCS, sono in linea con quanto riportato nella prima prova (Balouei et al. 2024) e in uno studio di El-Wahab et al. (2022), i quali hanno analizzato l'inclusione del 5%, 10% e 20% di HFM nella dieta di femmine adulte di Beagle.

In relazione al sesso, Wallis et al. (2024) hanno ipotizzato l'esistenza di un effetto sesso-specifico sul BCS nella specie canina, rappresentando un fattore rilevante per l'obesità nei cani. Nel loro studio, gli autori hanno osservato che le femmine di Labrador Retriever presentavano un BCS medio più alto rispetto ai maschi. Tuttavia,

è importante sottolineare che questo effetto dipendeva fortemente dallo stato riproduttivo: nei soggetti interi, il BCS delle femmine era superiore a quello dei maschi, mentre nei soggetti sterilizzati il BCS dei maschi superava quello delle femmine.

Le differenze significative nei valori di FCS ($p < 0.05$) tra i gruppi in alcuni momenti del campionamento (T3, T7 e T15) sono parzialmente in accordo con la prima prova e con gli studi di Pacheco et al. (2016), su Beagle adulti alimentati con diete contenenti il 7,5% e il 15% di HFM. In particolare, El-Wahab et al. (2022) hanno osservato un aumento dei valori di FCS con livelli di inclusione del 10% e 20% di HFM nella dieta di Beagle.

Deschamps et al. (2022) hanno evidenziato che la taglia del cane influenza la digestione e la composizione del microbiota, il che potrebbe spiegare, almeno in parte, le differenze tra il presente studio e quelli condotti su Beagle. Tuttavia, anche altri fattori, quali età, sesso, regimi alimentari precedenti e condizioni ambientali, potrebbero essere coinvolti, direttamente o indirettamente. Nonostante queste differenze, i valori di FCS tra i due gruppi si sono mantenuti entro i limiti di feci ben formate per tutti i cani durante l'intero periodo sperimentale (da T0 a T45), con punteggi fecali compresi tra 2,2 e 2,5 su una scala a 5 punti, indicando un intestino in buona salute.

5.2 MICROBIOTA

5.2.1 Trial 1

Gli effetti di un intervento dietetico a lungo termine con inclusione di farina di piume idrolizzate (HFM) nella dieta di femmine adulte di cane sono stati valutati in diversi momenti durante la prova, focalizzandosi su eventuali cambiamenti nella diversità microbica, nei taxa batterici specifici e sulle possibili associazioni con i parametri di salute degli animali.

I risultati della prima prova hanno evidenziato un impatto sulla popolazione microbica complessiva, come dimostrato da differenze significative nell'evenness e nell'indice di β -diversity tra le diete CTR e TRT. Tuttavia, l'interazione Dieta \times Tempo non è risultata significativa, suggerendo che l'effetto della dieta è rimasto costante nel corso dei 45 giorni della prova.

L'unico studio presente in letteratura che ha indagato gli effetti dell'integrazione alimentare con farina di piume sul microbiota fecale nei cani è quello di Hankel et al. (2020), il quale non ha rilevato cambiamenti significativi attribuibili a questo ingrediente. Gli autori hanno osservato solo una tendenza verso un aumento del rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes*, senza tuttavia riscontrare differenze a livelli tassonomici inferiori. È importante sottolineare che nello studio di Hankel et al. (2020) la farina di piume rappresentava una quota più bassa della dieta (2,7%) rispetto a quella impiegata nel presente studio (7%). Inoltre, è stata analizzata esclusivamente la regione ipervariabile V4 del gene 16S rRNA, e l'annotazione tassonomica è stata effettuata utilizzando il database SILVA (Quast et al., 2012), anziché Greengenes.

Anche la forma fisica dell'alimento può influenzare la composizione del microbiota fecale, con variazioni significative osservate tra diete estruse, semi-umide e casalinghe (Scarsella et al., 2020). Considerando che solo la dieta ha influenzato in modo significativo l'*evenness* e la β -diversity, le modifiche nella composizione del microbiota fecale sono state ulteriormente indagate mediante analisi discriminante (Tabella 6). I taxa individuati attraverso tale analisi sono stati successivamente esaminati con il test non parametrico di Kruskal-Wallis, utilizzando la dieta come variabile dipendente.

Nei cani con disbiosi (AlShawaqfeh et al., 2017), il genere *Streptococcus* è associato a un impatto negativo sulla salute intestinale, mentre i *Collinsella* spp. sono correlati a parametri clinici delle malattie infiammatorie intestinali, a causa del loro forte legame con le IgG a livello intestinale (Soontarak et al., 2019). Tuttavia, *Ruminococcus gnavus* è risultato ridotto nel gruppo TRT, nonostante sia considerato un batterio benefico per la salute intestinale sia nell'uomo che nel cane, poiché produttore di butirato (Louis et al., 2004). Per quanto riguarda la famiglia *Peptostreptococcaceae*, non emergono indicazioni particolarmente rilevanti dalla letteratura, sebbene questo taxon sia stato associato alla presenza di isovalerato e isobutirato nelle feci dei gatti, come risultato della fermentazione proteica (Birmingham et al., 2018). Non risulta semplice stabilire se tale associazione possa essere correlato a una maggiore quantità di proteine non digerite nell'intestino tenue nei cani alimentati con la dieta HFM rispetto a quella PM.

La RA di due specie di *Bacteroides* è risultata opposta tra le due diete: più elevata nella dieta PM per *Bacteroides coprophilus* e più elevata nella dieta HFM per *Bacteroides uniformis*. Nell'intestino umano, *Bacteroides uniformis* è riportato come un modulatore del GABA (Acido Gamma-Amminobutirrico, neurotrasmettitore inibitorio) (Strandwitz et al., 2019), mentre *Bacteroides coprophilus* è associato a risposte proinfiammatorie (Zhou et al., 2020). Tuttavia, il loro ruolo nell'ecosistema intestinale del cane non è ancora stato descritto in letteratura e, per tale ragione, merita indagini specifiche.

5.2.2 Trial 2

L'influenza della sostituzione della farina di pollo (PM) con farina di piume idrolizzate (HFM) sul microbiota intestinale di cani adulti, maschi e femmine, è stato valutato in diversi time points della prova. You & Kim (2021) hanno riportato che i cani sani ospitano prevalentemente batteri appartenenti ai phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, con un'abbondanza di *Fusobacterium* che varia in base a razza ed età. Studi condotti mediante tecniche di next-generation sequencing (Moon et al., 2018) hanno dimostrato che il microbiota intestinale di cani e gatti sani è ricco in *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, con una presenza significativa di *Proteobacteria*, phylum che comprende sia specie benefiche che patogeni opportunisti. A livello di famiglia, *Lachnospiraceae*, *Fusobacteriaceae*, *Prevotellaceae* e *Bacteroidaceae* risultano essere i gruppi più dominanti, evidenziando il loro ruolo chiave nell'ecosistema intestinale del cane (Figura 19).

La differente fonte proteica (farina di pollo e farine di piume) non ha influenzato la diversità delle specie microbiche, ma ciò non esclude la possibilità di differenze a livello di specifiche popolazioni microbiche o nelle loro capacità funzionali. La stabilità dell' α diversity tra le diverse condizioni analizzate in questo studio (Figura 20) suggerisce che l'inclusione della HFM non ha avuto un impatto negativo sul microbiota intestinale (Suchodolski, 2011), analogamente a quanto osservato nella prima prova. Tuttavia, nella seconda prova (Trial 2), nel corso di 45 giorni, non sono state riscontrate differenze significative nell' α diversity tra le diete, né nell'interazione Dieta \times Tempo, sebbene l'analisi abbia evidenziato una maggiore uniformità (*evenness*) nel gruppo HFM. Risultati analoghi a quelli del presente studio sono stati riportati anche da Pinto et al. (2022) e Hsu et al. (2024). Infatti, la struttura

della comunità microbica, valutata attraverso la β diversity (Figura 21), è risultata influenzata dalla presenza di HFM. Questo dato concorda con quanto osservato nella prima prova, che ha rilevato differenze nella β diversity a seguito della sostituzione della PM con HFM. L'effetto dell'inclusione di proteine idrolizzate sulla β diversity è stato segnalato anche da Pinto et al. (2022), Hsu et al. (2024) e Martínez-López et al. (2021). Per identificare i taxa influenzati dai trattamenti dietetici e dal sesso, è stata effettuata un'analisi LEfSe (Figura 23).

La diversa composizione amminoacidica tra queste due materie prime può influenzare la sequenza, il tipo, la carica e la disposizione tridimensionale delle proteine, determinando così i siti di clivaggio enzimatico (Balouei et al., 2024). Inoltre, le piume sono state trattate con pressione e vapore, un processo noto per ridurre la digeribilità delle proteine e modificare diversi amminoacidi, portando alla formazione di nuovi legami disolfuro e legami ammidici, che ostacolano l'idrolisi enzimatica nel tratto gastrointestinale (Qi et al., 2018). Il trattamento applicato alla HFM potrebbe influenzare negativamente la disponibilità degli amminoacidi solforati, in particolare della cisteina, nota per essere sensibile ai processi tecnologici (Moritz & Latshaw, 2001). Questi fattori possono influenzare la quantità di proteine non digerite e il tipo di peptidi presenti nell'intestino, modificando di conseguenza la composizione del microbiota, come riportato nella revisione sistematica di Wu et al. (2022), che hanno effettuato sei studi su topi, sette su suini, quindici su ratti e uno in vitro.

Kim et al. (2017) nel confronto tra diete naturali e commerciali hanno osservato differenze significative nella diversità e nella composizione del microbiota fecale. Inoltre, in cani alimentati con una dieta a base di carne si è osservata una riduzione del peso fecale, un miglioramento della digeribilità di proteine ed energia e cambiamenti significativi nel microbiota fecale rispetto a una dieta a base di crocchette. In particolare, i generi *Bacteroides*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus* e *Faecalibacterium* sono diminuiti, mentre *Fusobacterium*, *Lactobacillus* e *Clostridium* sono aumentati (Bermingham et al., 2017). Al contrario, Pinto et al. (2022) non hanno riportato variazioni significative nella composizione del microbiota fecale di cani alimentati con diete contenenti fegato di pollo idrolizzato, farine di sottoprodotti avicoli e farine di carne e ossa bovine. Va sottolineato che l'aumento dei taxa appartenenti alla famiglia *Fusobacteriaceae*, considerata un marcatore di salute intestinale (Pilla & Suchodolski,

2021), potrebbe suggerire l'assenza di effetti negativi dell'HFM nella dieta dei cani. La famiglia degli *Enterobacteriaceae* risultava più elevata nella dieta TRT, ma sia negli studi di Hankel et al. (2020) che nel trial 1 da noi condotto non è stato osservato un aumento significativo di questa famiglia. Gli *Enterobacteriaceae*, appartenenti al phylum *Proteobacteria*, non sono solo una famiglia di batteri potenzialmente patogeni, ma svolgono anche un ruolo importante nella degradazione di carboidrati e proteine e nel mantenimento dell'omeostasi dell'ossigeno nell'intestino di cani sani (Moon et al., 2018).

Le variazioni del microbiota in relazione alla fonte e al contenuto proteico sembrano non seguire una regola rigorosa, e tra i diversi studi sono stati riportati risultati contrastanti. Queste differenze dipendono dal contesto sperimentale, come il momento del campionamento, il numero di animali coinvolti, l'età, il sesso, la composizione della dieta e, più in generale, da fattori ambientali, inclusa il microbiota ambientale, che rendono difficile un confronto diretto tra gli studi. Gli effetti dell'inclusione dietetica di HFM sul microbiota fecale nei cani sono stati indagati anche da Hankel et al. (2020), i quali non hanno riscontrato variazioni significative né nella diversità né nell'abbondanza relativa (RA) dei taxa, probabilmente a causa della minore quantità di farina di piume utilizzata (2,7%) rispetto al presente studio. Inoltre, i risultati della seconda prova non concordano con quelli ottenuti nella prima, in cui la dieta TRT aveva causato una riduzione della RA di *Ruminococcus gnavus*, *Bacteroides coprophilus*, *Collinsella stercoris* e *Streptococcus*, e un aumento di *Bacteroides uniformis*. Risultati simili a quelli ottenuti nel trial 1 sono stati osservati solo per la famiglia *Peptostreptococcaceae* con un incremento nel gruppo TRT rispetto al gruppo CTR.

La letteratura sull'effetto del sesso sul microbiota fecale nei cani è ancora limitata. Scarsella et al. (2020) hanno riscontrato differenze significative tra cani maschi, femmine e castrati, mentre Jha et al. (2020) non hanno osservato variazioni nella diversità tra i sessi in una popolazione di animali domestici negli Stati Uniti. Tuttavia, in quest'ultimo caso, i campioni fecali sono stati raccolti da cani che vivevano in condizioni molto eterogenee, in termini di dieta e ambiente di vita, fattori che potrebbero aver mascherato eventuali relazioni tra microbiota e sesso.

Analogamente, Pereira et al. (2020) non hanno riscontrato effetti del sesso sul microbiota fecale nei cuccioli in accrescimento.

Il ruolo del sesso nel modellare le popolazioni microbiche intestinali è stato invece studiato più approfonditamente nell'uomo. D'Afflitto et al. (2022), in una revisione sistematica, hanno riportato un'associazione tra ormoni sessuali e composizione o diversità del microbiota, una relazione osservata anche nei topi (Org et al., 2016). In particolare, nelle donne la concentrazione di estrogeni è stata associata a un aumento di *Bacteroidetes*, a una diminuzione di *Firmicutes* e *Ruminococcaceae*, e a un incremento della diversità microbica. Negli uomini, il testosterone è risultato positivamente associato ai generi *Ruminococcus* e *Acinetobacter*, oltre che a una maggiore diversità microbica.

Differenze nelle dimensioni dell'intestino tra cani femmine e maschi potrebbero influenzare il tempo di transito del cibo, interagendo così con il microbiota. Questo dato suggerisce che fattori specifici legati al sesso possano influenzare la composizione del microbiota intestinale, impattando potenzialmente il modo in cui cani maschi e femmine rispondono agli interventi dietetici. Alcuni taxa specifici, infatti, mostravano variazioni significative nell'abbondanza batterica tra i gruppi. L'effetto del sesso sul microbiota intestinale nei cani merita quindi studi mirati per chiarire quali fattori anatomici ed endocrini possano modellare la popolazione microbica.

5.3 DIGERIBILITA' APPARENTE

5.3.1 Trial 1

I risultati osservati sulla digeribilità apparente sono paragonabili a quelli di Pacheco et al. (2016) in cani adulti di razza Beagle alimentati con diete contenenti il 7,5% di HFM, mentre con diete contenenti il 15% di HFM, gli stessi Autori hanno osservato una limitata capacità del tratto gastrointestinale di digerire la farina di piume. È possibile che l'inclusione di HFM in quantità superiori alla capacità digestiva del cane riduca la solubilità dell'ingrediente e ne aumenti la resistenza agli enzimi digestivi, come pepsina e tripsina (Grazziotin et al., 2006).

Come già detto in precedenza, la qualità delle feci nei cani può essere influenzata da molteplici fattori, tra cui la digeribilità dei nutrienti, l'assunzione di alimento e la composizione dell'attività microbica nel tratto gastrointestinale

(Wakshlag et al., 2011; Do et al., 2021). Indagini precedenti hanno evidenziato effetti negativi della farina di piume estrusa sulla digeribilità dei nutrienti negli alimenti per cani (Murray et al., 1997; Cavalari et al., 2006) e sulla consistenza fecale, con feci molli come conseguenza della bassa digeribilità dei nutrienti (Twomey et al., 2003; Carciofi et al., 2006). Confrontando la digeribilità dei nutrienti di alimenti per cani contenenti farina di piume idrolizzate con altri idrolizzati proteici derivati da sottoprodotti animali, Cavalari et al. (2006) hanno riportato che le diete contenenti farina di piume estrusa presentavano coefficienti inferiori di digeribilità apparente totale per l'energia lorda (79,8%), la sostanza secca (76,0%) e la proteina grezza (82,3%), rispetto a quelle contenenti farina di pesce estrusa (99,1%, 85,2% e 91,9%), farina di sottoprodotti avicoli estrusa (91,2%, 88,1% e 88,9%), farina di sottoprodotti avicoli non estrusa (87,6%, 86,7% e 88,0%) e farina di carne estrusa (80,7%, 87,8% e 82,3%), rispettivamente. Un altro fattore che contribuisce alla variabilità nella composizione nutrizionale della farina di piume è la contaminazione con altri sottoprodotti del pollo, come sangue, zampe, teste e visceri, che possono incrementare il contenuto di grassi e ceneri della farina stessa (Kim & Patterson, 2000; Bertsch & Coello, 2005).

La digestione e l'assorbimento delle proteine sono fattori chiave che influenzano la qualità delle feci. Come già riportato nel paragrafo sulle performance, El-Wahab et al. (2022) hanno osservato un aumento dei punteggi fecali in cani Beagle alimentati con diete contenenti il 10% e il 20% di farina di piume idrolizzata (HFM), nonostante la digeribilità apparente della proteina grezza non risultasse influenzata dalla dieta. I risultati ottenuti nel presente studio indicano che l'inclusione del 7% di HFM nella dieta del cane non compromette la digeribilità apparente delle proteine. Tale digeribilità è influenzata non solo dalla composizione della dieta e dalla qualità degli ingredienti, ma anche dal processo tecnologico applicato (El-Wahab et al., 2022). Il processo di *rendering* applicato alle piume può modificare la disponibilità dei nutrienti nella farina di piume idrolizzata (Lee et al., 2022). Poiché entrambe le diete (PM e HFM) contenevano gli stessi ingredienti e valori analitici, differendo soltanto per la fonte proteica (farina di pollo vs farina di piume idrolizzate), è plausibile che una tecnica di idrolisi adeguata abbia reso la farina di piume comparabile in termini di digeribilità apparente della proteina grezza, sia all'inizio sia alla fine della prova.

Un ulteriore fattore che può influenzare la digeribilità della HFM, e di conseguenza la qualità delle feci, è la produzione di cataboliti derivanti dalla fermentazione intestinale dei carboidrati o delle proteine, variabile in base all'intensità del processo fermentativo. Un'elevata attività fermentativa porta a un aumento della biomassa batterica e alla produzione di numerosi metaboliti, in particolare acidi grassi a corta catena (SCFA). L'accumulo di prodotti finali della fermentazione può alterare l'equilibrio osmotico nel colon, favorendo il passaggio di acqua e sodio nel lume intestinale (El-Wahab et al., 2022). Il forte potere osmotico di tali composti può aumentare la pressione osmotica intraluminale, inducendo secrezione e/o ritenzione di acqua nel colon (Macfarlane & Cummings, 1991).

Considerando che il contenuto di acqua nelle feci dipende strettamente dall'assorbimento lungo il tratto intestinale, è plausibile ipotizzare un ruolo chiave di questo meccanismo nella formazione di feci umide e poco consistenti (Zentek & Meyer, 1995; Meyer et al., 1999;). Tuttavia, nel presente studio, l'interazione tra Dieta e Tempo non ha influenzato in modo significativo il contenuto totale di SCFA, né ha alterato la consistenza fecale durante il periodo sperimentale.

5.3.2 Trial 2

Nella seconda prova, l'analisi della digeribilità apparente ha mostrato un effetto significativo in relazione alla variabile Tempo su tutti i nutrienti considerati (sostanza secca, proteine, grassi, amido e sostanza organica), evidenziando come il tratto gastrointestinale si adatti progressivamente durante il periodo di somministrazione delle diete. La variabile Dieta, invece, ha influenzato significativamente la digeribilità della sostanza secca, dell'amido e della sostanza organica, sebbene al termine della prova (T45) non si siano riscontrate differenze statisticamente rilevanti tra il gruppo CTR e TRT. Inoltre, non è stata osservata alcuna significatività per l'interazione Dieta x Tempo, suggerendo un andamento di digeribilità stabile e simile per entrambe le formulazioni alimentari. Questi risultati confermano e ampliano le evidenze emerse nella prima prova, nella quale si era registrata una significativa interazione Dieta x Tempo per sostanza secca, amido, grassi e sostanza organica, ma con un andamento complessivo della digeribilità apparente simile tra le diete. In entrambe le prove, nonostante variazioni temporali e qualche differenza iniziale, i valori di digeribilità al termine del periodo sperimentale

si sovrappongono, indicando un adattamento gastrointestinale e una capacità digestiva comparabile indipendentemente dalla fonte proteica utilizzata.

Guardando più nel dettaglio ai dati, la digeribilità della sostanza secca nel gruppo TRT è risultata leggermente superiore nella seconda prova (intorno all'86-88%) rispetto alla prima prova (tra il 79,5% e l'86,7%). Per quanto riguarda l'amido, in entrambe le prove la digeribilità è risultata molto elevata (>90%), con valori leggermente più alti e più stabili nel trial 2. Anche la digeribilità dei grassi ha mostrato un andamento simile tra le due prove, con valori elevati e tendenzialmente in aumento verso la fine del periodo di somministrazione, senza differenze significative tra diete, confermando che l'inclusione della farina di piume idrolizzata non compromette l'assorbimento lipidico. La sostanza organica ha seguito un andamento analogo, con una progressiva stabilizzazione dei valori nel tempo, indice di una maturazione dell'ambiente intestinale e del microbiota (Do et al., 2021; Wakshlag et al., 2011). Questi dati sono in linea con quanto riportato in letteratura riguardo all'impatto del processo tecnologico di idrolisi sulla qualità nutrizionale della farina di piume. Lee et al. (2022) hanno evidenziato come il *rendering* e l'idrolisi possano migliorare la disponibilità degli aminoacidi e la digeribilità proteica, rendendo la farina di piume idrolizzata comparabile ad altre fonti proteiche animali. Analogamente, El-Wahab et al. (2022) hanno osservato che diete contenenti fino al 20% di farina di piume idrolizzata non compromettevano la digeribilità della proteina grezza né la qualità delle feci in cani adulti. Inoltre, l'assenza di differenze significative nella digeribilità proteica tra le due diete in entrambe le prove suggerisce che la farina di piume idrolizzata rappresenta un ingrediente proteico efficiente e ben tollerato, la cui digeribilità non viene limitata da processi fermentativi avversi o da un eccesso di componenti non digeribili. Infatti, la fermentazione proteica intestinale può produrre cataboliti che influenzano la consistenza fecale e l'assorbimento di acqua, ma in questo studio non si sono riscontrate variazioni significative di questi parametri (Macfarlane & Cummings, 1991; Meyer et al., 1999; El-Wahab et al., 2022).

5.4 PRODOTTI DELLA FERMENTAZIONE

5.4.1 Acidi Grassi Volatili

5.4.1.1 Trial 1

È noto, come già descritto in precedente, che diversi fattori possono influenzare la qualità delle feci. Un elemento determinante è rappresentato dalla composizione del microbiota gastrointestinale, che può svolgere un ruolo significativo nella modulazione della funzionalità intestinale (Wakshlag et al., 2011; Do et al., 2021). La qualità fecale è strettamente correlata ai metaboliti prodotti dalla fermentazione microbica, i quali influenzano direttamente le caratteristiche delle feci, inclusa la loro consistenza. Un'elevata attività fermentativa può determinare un aumento della biomassa batterica e la produzione di una quantità significativa di metaboliti derivati dalla fermentazione, in particolare acidi grassi a corta catena (SCFA). Il marcato potere osmotico di questi composti può aumentare la pressione osmotica intraluminale, inducendo secrezione e/o ritenzione di acqua nel colon (Macfarlane & Cummings, 1991).

In questo studio, considerando che entrambe le diete erano formulate con gli stessi ingredienti, ad eccezione della fonte proteica di origine animale (farina di piume idrolizzate vs farina di pollo), l'attenzione è stata rivolta in particolare alla fermentazione delle proteine e alla produzione dei relativi metaboliti finali. Analogamente a quanto avviene per la fermentazione delle fibre, anche la fermentazione proteica dà origine ad acidi grassi a catena corta (SCFA); tuttavia, a questi si associano anche composti tipici della fermentazione proteolitica, quali acidi grassi a catena ramificata (BCFA), ammoniaca, ammine, idrogeno solforato, fenoli e indoli (Macfarlane et al., 1992; Diether & Willing, 2019).

Gli acidi grassi a catena ramificata rappresentano marcatori affidabili dell'attività fermentativa proteica, poiché derivano esclusivamente dalla fermentazione degli amminoacidi a catena ramificata, come valina, leucina e isoleucina (Diether & Willing, 2019). Molti di questi prodotti sono identificati anche come molecole bioattive. Tra questi, l'isobutirrato rappresenta il BCFA di maggiore rilevanza, per via delle sue similitudini strutturali e funzionali con il butirrato (Charney et al., 1999). Recentemente, Higuera et al. (2024) hanno attribuito all'isobutirrato proprietà antinfiammatorie, evidenziando la sua capacità di modulare l'attività del

fattore nucleare kappa B (NF- κ B), un complesso proteico che regola numerosi processi cellulari, tra cui l'infiammazione, l'immunità e la proliferazione cellulare.

Nel presente studio, le concentrazioni fecali di acidi grassi volati (SCFA, BCFA e la somma di SCFA e BCFA) sono risultate significativamente più elevate nei cani alimentati con farina di piume idrolizzate rispetto a quelli alimentati con farina di pollo. Tale incremento suggerisce una maggiore attività fermentativa nel gruppo TRT, verosimilmente associata a differenze nella composizione e nella diversità del microbiota intestinale, nonché alla presenza di specifici taxa batterici capaci di metabolizzare substrati proteici in misura differente. Non è semplice stabilire con certezza se l'aumentata produzione di metaboliti fermentativi osservata nei soggetti del gruppo TRT sia direttamente riconducibile a una maggiore quota di proteine non digerite che raggiungono l'intestino crasso rispetto al gruppo CTR. Tuttavia, come già discusso, il processo di idrolisi a cui vengono sottoposte le piume può alterare la struttura degli amminoacidi, favorendo la formazione di legami disolfuro e ammidici. Queste modificazioni strutturali riducono la suscettibilità delle proteine all'idrolisi enzimatica lungo il tratto gastrointestinale, compromettendone parzialmente la digeribilità (Qi et al. 2018). Questi fattori possono influenzare sia la quantità di proteine non digerite sia la tipologia di peptidi che raggiungono l'intestino, con possibili ripercussioni sulla composizione e sulla funzionalità del microbiota intestinale (Wu et al. 2022). Infatti, l'analisi del microbiota intestinale ha evidenziato 9 taxa significativamente differenti, 6 dei quali mostravano variazioni significative in relazione alla dieta somministrata (PM vs HFM), secondo il test di Kruskal-Wallis. In particolare, è stata osservata un'abbondanza relativa (RA) significativamente più elevata di *Streptococcus*, *Collinsella stercoris*, *Ruminococcus gnavus* e *Bacteroides coprophilus*. Nei cani alimentati con la HFM è stata osservata una maggiore RA di *Peptostreptococcaceae* e *Bacteroides uniformis*. Tali differenze nella composizione microbica potrebbero contribuire a spiegare i valori fecali di butirrato e isobutirrato rilevati nel presente studio. In particolare, la concentrazione media più bassa di butirrato riscontrata nel gruppo TRT potrebbe essere attribuibile alla minore abbondanza relativa di *Ruminococcus gnavus*, rilevata in questo gruppo rispetto al gruppo CTR. Questa specie, infatti, è nota per la sua capacità di produrre butirrato, un acido grasso a corta catena con riconosciute proprietà benefiche a livello intestinale

(Louis et al., 2004). I valori medi più elevati di isobutirrato riscontrati nelle feci del gruppo TRT potrebbero essere attribuiti alla maggiore abbondanza relativa di *Peptostreptococcaceae*, osservata nello stesso gruppo. Questo taxon, infatti, è stato precedentemente associato alla produzione fecale di acidi grassi a catena ramificata come isovalerato e isobutirrato nei gatti (Bermingham et al., 2018), suggerendo un ruolo potenzialmente analogo anche nel microbiota intestinale canino. I risultati ottenuti sono in linea con quanto riportato da El-Wahab et al. (2022), i quali hanno osservato un incremento delle concentrazioni fecali di isobutirrato in cani alimentati con diete contenenti HFM. Inoltre, i rapporti tra i principali acidi grassi a catena corta (SCFA) osservati nel presente studio (acetato, propionato e butirrato) sono in linea con quelli documentati nella letteratura per cani sani, rispettivamente pari al 67–78%, 12–20% e 7–16% della concentrazione totale di SCFA (Minamoto et al., 2019; Kilburn et al., 2020; Pan et al., 2025). Al contrario, valori significativamente alterati di tali proporzioni sono stati riportati in soggetti affetti da enteropatie infiammatorie, suggerendo che il profilo degli SCFA ottenuto nel nostro studio sia indicativo di uno stato di salute intestinale ottimale (Higueras et al., 2024).

5.4.1.2 Trial 2

I risultati della seconda prova confermano e ampliano le osservazioni riguardanti l'influenza della fonte proteica sulla fermentazione intestinale e la produzione di acidi grassi volatili nei cani. Come osservato nel trial 1, anche nel corso del trial 2 la dieta ha determinato differenze significative nei profili fecali di SCFA e BCFA, indicando un impatto diretto della fonte proteica sulla composizione e funzionalità del microbiota intestinale (Wakshlag et al., 2011; Do et al., 2021).

In particolare, le feci dei cani del gruppo TRT, alimentati con una dieta HFM, hanno determinato concentrazioni significativamente maggiori di acetato e butirrato rispetto al gruppo CTR, mentre le concentrazioni di propionato e isobutirrato sono risultate più elevate nel gruppo CTR per tutta la durata della prova (da T0 a T45). Questi risultati differiscono in parte da quelli osservati nella prima prova, in cui il gruppo TRT ha mostrato concentrazioni più elevate di isobutirrato, di SCFA totali e della somma degli acidi organici (SOA), mentre il butirrato è risultato più abbondante nel gruppo CTR all'inizio della prova. La divergenza potrebbe essere attribuibile a differenti condizioni sperimentali, variazioni nella composizione microbica o nella

qualità delle fonti proteiche, sottolineando la complessità delle interazioni tra dieta, microbiota e fermentazione proteica.

L'aumento significativo di acetato e butirrato nel gruppo TRT è correlata alla fermentazione proteolitica e alla produzione di SCFA, acidi grassi notoriamente benefici per la salute intestinale, grazie al loro ruolo nel mantenimento dell'integrità della barriera mucosa e nell'effetto antinfiammatorio (Macfarlane & Cummings, 1991; Louis et al., 2004). In particolare, il butirrato è noto per fornire energia ai colonociti, regolare l'omeostasi immunitaria e contribuire alla salute della mucosa intestinale, supportando così un ambiente intestinale equilibrato (Higueras et al., 2024). Al contrario, il gruppo CTR ha mostrato concentrazioni più alte di propionato e isobutirrato, che riflettono differenti vie metaboliche e fermentative. L'isobutirrato, come acido grasso a catena ramificata (BCFA), è un marker della fermentazione proteica, derivante dalla degradazione degli amminoacidi a catena ramificata (Diether & Willing, 2019). Nel trial 1, un aumento dell'isobutirrato è stato osservato nei cani del gruppo TRT, mentre nel trial 2 si è osservato un effetto contrario, suggerendo possibili variazioni nell'attività proteolitica microbica o nel tipo di substrati disponibili per il microbiota tra le due prove, forse legate a differenze sperimentali o al periodo di adattamento delle colonie batteriche.

Il confronto tra le due prove evidenzia inoltre che la somma totale degli acidi organici (SOA) e degli SCFA rimane generalmente più elevata nel gruppo TRT, rafforzando l'ipotesi di una fermentazione più attiva in presenza di farina di piume idrolizzate, presumibilmente legata alla minore digeribilità e alla maggiore disponibilità di substrati fermentescibili nel colon (Qi et al., 2018; Wu et al., 2022). Tale fermentazione più intensa, tuttavia, non ha compromesso la salute intestinale, come suggerito dalla stabilità del profilo degli SCFA e dalla letteratura che associa queste concentrazioni a condizioni fisiologiche ottimali (Minamoto et al., 2019; Kilburn et al., 2020; Pan et al., 2025). Infine, la diversità e la composizione microbica già emerse nel trial 1 (con modificazioni in taxa quali *Streptococcus*, *Peptostreptococcaceae* e *Ruminococcus*) possono spiegare parte delle differenze osservate nei metaboliti prodotti, ribadendo il ruolo centrale del microbiota nell'adattamento metabolico a differenti fonti proteiche (Birmingham et al., 2018; El-Wahab et al., 2022).

5.4.2 Ammine biogene

5.4.2.1 Trial 1

Tra i metaboliti derivanti dalla fermentazione proteica nel colon, le ammine biogene rivestono un ruolo di particolare interesse per i loro effetti sulla salute intestinale. La variazione della composizione del microbiota indotta dalla dieta potrebbe anche contribuire alla modulazione delle concentrazioni fecali di poliamine. Secondo Holmes et al. (2017), l'alimentazione può influenzare la produzione microbica di poliamine intestinali, composti bioattivi coinvolti in molteplici funzioni cellulari. L'aumento della popolazione di batteri proteolitici può favorire una maggiore produzione di queste molecole, attraverso un incremento della disponibilità di substrati derivanti dalla fermentazione proteica (Bekebrede et al., 2020).

Le ammine biogene, tra cui putrescina, spermina e spermidina, sono basi organiche azotate, a basso peso molecolare e non volatili, originate dalla decarbossilazione degli amminoacidi ad opera della microflora del colon. Nell'uomo e negli animali, queste molecole sono presenti in tutte le cellule viventi e rivestono un ruolo fondamentale nei processi metabolici e nella crescita di tessuti e organi (Bardócz et al., 1993). Tuttavia, concentrazioni elevate di metaboliti derivanti dalla fermentazione proteica, comprese le ammine biogene, possono avere effetti negativi sull'epitelio del colon compromettendo la funzionalità intestinale (Blachier et al., 2007).

I sottoprodotti di origine animale, in particolare quelli derivati da pollame e carne, sono comunemente impiegati nelle diete per animali da compagnia per via del loro elevato valore nutrizionale e dell'elevata appetibilità (Pinto et al., 2023). Tuttavia, questi ingredienti possono rappresentare anche una potenziale fonte di ammine biogene (Feddern et al., 2019). Tra i sottoprodotti del pollame, l'impiego crescente di proteine idrolizzate è giustificato non solo per l'aumentata digeribilità, ma anche per la presenza di peptidi bioattivi dotati di proprietà funzionali, come l'attività antimicrobica, antiossidante, antipertensiva e immunomodulatoria (Cave, 2006; Hou et al., 2017). Tuttavia, il processo di idrolisi proteica comporta la liberazione di amminoacidi liberi in quantità rilevanti, che potrebbero favorire una maggiore produzione di ammine biogene e, conseguentemente, un aumentato consumo nei cani

alimentati con tali ingredienti (Feddern et al., 2019; Ruiz-Capillas & Herrero, 2019). Pinto et al. (2023) hanno ipotizzato che le diete contenenti HFM possano determinare un aumento dell'assunzione alimentare di precursori amminoacidici e, di conseguenza, una maggiore escrezione fecale di ammine biogene. Nel presente studio, la dieta ha effettivamente esercitato un effetto significativo su tutte le ammine biogene analizzate. Tra queste, cadaverina e putrescina sono risultate le più abbondanti nei campioni fecali con un trend positivo nei cani alimentati con la dieta contenente piume di pollo idrolizzate. Inoltre, anche le concentrazioni di triptamina e feniletilamina sono risultate significativamente più alte nei soggetti appartenenti al gruppo TRT, suggerendo un possibile aumento della decarbossilazione microbica di triptofano e fenilalanina, favorita dalla disponibilità di substrati derivanti dalla fermentazione proteica. Questi risultati suggeriscono che le maggiori concentrazioni di ammine biogene osservate nelle feci del gruppo TRT potrebbero essere attribuite ad una maggiore assunzione con la dieta contenente piume di pollo idrolizzate. Tuttavia, studi recenti condotti sulla tossicità in vitro delle ammine biogene sulle cellule intestinali hanno evidenziato che gli effetti citotossici sono stati riscontrati in alimenti con concentrazioni di ammine biogene significativamente superiori a quelle osservate nella dieta con il 7% di piume di pollo idrolizzate utilizzata nel presente studio (Montegiove et al., 2023). Sánchez-Pérez et al. (2022) hanno dimostrato che cadaverina e putrescina possono interferire con il metabolismo dell'istamina a livello epiteliale, poiché entrambe competono per la conversione enzimatica da parte della diamino ossidasi. Secondo Deloyer et al. (2000), putrescina e spermina, se presenti in concentrazioni moderate, svolgono un ruolo fisiologico positivo, in quanto sono coinvolte nel normale turnover cellulare e nei processi di apoptosi. Inoltre, Löser et al. (1999) hanno osservato che ratti alimentati a lungo con una dieta priva di poliamine sviluppavano ipoplasia della mucosa del colon, sottolineando l'importanza delle poliamine luminali nel mantenimento dell'integrità e del rinnovamento dell'epitelio intestinale. Complessivamente, le concentrazioni di ammine biogene rilevate nel presente studio risultano in linea con quelle riportate in precedenti lavori condotti su cani sani (Bastos et al., 2020; Pinto et al., 2023) e molto inferiori alle concentrazioni ritenute potenzialmente dannose per la salute degli animali domestici (Montegiove et al., 2023).

5.4.2.2 Trial 2

Le ammine biogene fecali continuano a rappresentare importanti indicatori dei processi fermentativi proteici a livello intestinale e della composizione microbica influenzata dalla dieta. Anche nella seconda prova, i principali metaboliti rilevati sono stati putrescina, cadaverina e spermina, confermando quanto osservato nel trial 1. Come già evidenziato da Holmes et al. (2017), la modulazione dietetica del microbiota può influenzare la produzione microbica di poliamine intestinali, coinvolte in numerose funzioni cellulari.

Nella seconda prova, la variabile Dieta, Tempo e l'interazione Dieta x Tempo hanno avuto un impatto significativo su tutte le ammine biogene e sulla somma totale, suggerendo una dinamica complessa e temporale nella fermentazione proteica intestinale. In particolare, le concentrazioni di putrescina e cadaverina sono risultate costantemente più elevate nel gruppo TRT durante tutto il periodo di studio, evidenziando come l'impiego della dieta contenente piume di pollo idrolizzate favorisca una maggiore disponibilità di substrati per i batteri proteolitici, come osservato anche da Bekebrede et al. (2020) e Pinto et al. (2023).

Un aspetto interessante riguarda il comportamento della spermina, la cui concentrazione è risultata significativamente più alta nel gruppo CTR rispetto al TRT per quasi tutti i tempi di campionamento, fatta eccezione per T15, dove si è osservata un'inversione del trend con concentrazioni maggiori nel gruppo TRT. Questa variazione temporale potrebbe indicare una complessa regolazione metabolica della spermina, coerente con il ruolo fisiologico noto delle poliamine, come spermina e putrescina, nel turnover cellulare e nella regolazione dell'apoptosi Deloyer et al. (2000).

Confrontando le due prove sperimentali, si osserva una conferma della tendenza a maggiori concentrazioni di putrescina e cadaverina nel gruppo TRT, suggerendo una robusta associazione tra dieta contenente piume di pollo idrolizzate e aumento della fermentazione proteica intestinale. La persistenza di concentrazioni elevate di putrescina e cadaverina è coerente con l'ipotesi di un aumento dell'assunzione di precursori amminoacidici, come suggerito da Feddern et al. (2019) e Ruiz-Capillas & Herrero (2019).

È importante sottolineare che, analogamente alla prima prova, le concentrazioni di ammine biogene rilevate rimangono al di sotto delle soglie citotossiche evidenziate da Montegiove et al. (2023), indicando un profilo di sicurezza nutrizionale. Inoltre, il possibile ruolo modulatore delle ammine biogene sulla funzionalità epiteliale, come discusso da Sánchez-Pérez et al. (2022) e Blachier et al. (2007), suggerisce che le variazioni osservate potrebbero influenzare l'omeostasi intestinale senza comportare effetti negativi.

6. CONCLUSIONI

I risultati degli studi che hanno considerato l'effetto della farina di piume di pollo idrolizzata (HFM) come fonte proteica alternativa nelle diete per Setter inglesi adulti, hanno posto l'attenzione sulle performance degli animali, sul microbiota fecale, sulla digeribilità apparente dei nutrienti e sui prodotti della fermentazione microbica. I due trial (trial 1 e trial 2) si differenziavano per la composizione del campione: nel trial 1 erano presenti esclusivamente soggetti di sesso femminile, mentre nel trial 2 erano inclusi sia soggetti di sesso maschile che femminile, consentendo una valutazione più ampia delle risposte alla dieta.

In entrambi gli studi, gli animali hanno mostrato un'elevata accettabilità del mangime, consumando interamente la razione giornaliera e mantenendo una buona condizione di salute generale. Questi dati suggeriscono che la farina di piume di pollo idrolizzata rappresenta un ingrediente nutrizionalmente valido e appetibile per i cani adulti.

L'inclusione del 7% di farina di piume idrolizzate nella dieta non ha evidenziato alcun effetto negativo sulle performance dei cani e sulla consistenza fecale, che si è mantenuta tra 2 e 2,5, valori riconosciuti come 'ideali'.

L'analisi del microbiota fecale ha messo in luce un profilo microbico differente nei gruppi alimentati con diete contenenti la farina di piume di pollo idrolizzate rispetto ai gruppi controllo, tuttavia senza compromettere l'equilibrio e la stabilità della comunità microbica intestinale. I cambiamenti osservati sono compatibili con un microbiota sano e funzionale, coerentemente con i punteggi fecali ideali registrati.

Per quanto riguarda la digeribilità dei nutrienti, i risultati ottenuti in entrambe le prove rafforza l'ipotesi che la farina di piume idrolizzata, se correttamente processata e inclusa nella dieta fino al 7%, può sostituire efficacemente la farina di pollo, garantendo una digeribilità dei nutrienti comparabile, senza effetti negativi sulla funzionalità gastrointestinale e sulla qualità delle feci.

I risultati ottenuti sui prodotti della fermentazione microbica, indicano che gli acidi grassi volati ottenuti con l'inclusione della farina di piume di pollo idrolizzate nella dieta del cane, pur influenzando l'attività fermentativa e la composizione del microbiota intestinale, non hanno compromesso la salute intestinale, evidenziando adattamenti microbici compatibili con un profilo metabolico equilibrato.

Per quanto riguarda la fermentazione proteica intestinale, valutata attraverso le concentrazioni di ammine biogene, entrambe le prove sperimentali hanno mostrato un aumento di specifici metaboliti quali putrescina e cadaverina nei soggetti alimentati con la farina di piume di pollo idrolizzate, confermando la maggiore disponibilità di substrati proteici derivanti dall'inclusione di questa fonte. Importante è stato riscontrare che tali aumenti non hanno raggiunto soglie citotossiche, garantendo la sicurezza nutrizionale della dieta. Parallelamente, la spermina, una poliamina con ruolo fisiologico nel turnover cellulare e nella regolazione dell'apoptosi, ha mostrato un andamento differente rispetto ad altre ammine biogene, suggerendo una complessa regolazione metabolica che meriterebbe approfondimenti futuri. Quindi, i risultati indicano come la dieta contenente farina di piume idrolizzate possa modulare in modo significativo la fermentazione proteica intestinale e la produzione di metaboliti microbici, con potenziali effetti positivi sulla salute gastrointestinale.

In conclusione, i risultati ottenuti nelle due prove sperimentali confermano la fattibilità e la sostenibilità dell'utilizzo di questa materia prima nel settore del pet food, offrendo un modello di filiera innovativo che integra i principi dell'economia circolare e della sostenibilità ambientale, contribuendo al riutilizzo efficiente delle risorse e alla riduzione degli sprechi. La farina di piume idrolizzate si configura come un ingrediente sostenibile e innovativo, in grado di integrare le filiere produttive esistenti e rispondere alle crescenti esigenze di sostenibilità ambientale e qualità nutrizionale nel mercato del pet food, elementi sempre più rilevanti nel settore dell'alimentazione degli animali da affezione.

Infine, i risultati promettenti ottenuti giustificano ulteriori studi, anche a lungo termine, per approfondire l'influenza dei diversi processi di lavorazione della farina di piume di pollo idrolizzate sul microbiota intestinale e la risposta dose-dipendente, nonché per estendere queste indagini ad altre fonti proteiche alternative.

I risultati emersi da questi studi costituiscono il nostro contributo al progetto di ricerca "Valorizzazione mangimistica di scarti biologici della produzione avicola, di cascame termico industriale e di CO₂" (acronimo BIO=C=O), PON-MISE I&C 2014–2020 FESR, ASSE 6 REACT, Priorità di investimento 13. i Azione I, "Finanziato nell'ambito della risposta dell'Unione alla pandemia di COVID-19", codice del progetto N. F/200078/03/X45. I risultati ottenuti evidenziano come l'utilizzo di

sottoprodotti di origine animale, in particolare la farina di piume, quale ingrediente nei mangimi per animali da compagnia, possa rappresentare una strategia efficace per promuovere la sostenibilità ambientale. Tale approccio si configura, da un lato, come un mezzo per ridurre la quantità di scarti organici potenzialmente inquinanti, e, dall'altro, come un'opportunità per rafforzare i principi dell'economia circolare, attraverso il recupero e la valorizzazione di residui provenienti dalla filiera agro-zootecnica. Inoltre, considerando che le piume di pollo possono essere ottenute da sottoprodotti della produzione locale, il loro impiego nei mangimi contribuirebbe a ridurre la dipendenza da materie prime di importazione, con un conseguente contenimento dell'impronta di carbonio associata al settore dell'alimentazione animale.

7. BIBLIOGRAFIA

- AAFCO. (2019). *Official publication of the Association of American Feed Control Officials*. Atlanta, GA.
- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Science translational medicine*, 6(237), 237ra65-237ra65. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
- Acuff, H. L., Dainton, A. N., Dhakal, J., Kiprotich, S., & Aldrich, G. (2021). Sustainability and pet food: is there a role for veterinarians? *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 51(3), 563-581. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2021.01.010>
- Alarcón, T., Llorca, L., & Perez-Perez, G. (2017). Impact of the microbiota and gastric disease development by *Helicobacter pylori*. *Molecular pathogenesis and signal transduction by Helicobacter pylori*, 253-275. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50520-6_11
- Alessandri, G., Milani, C., Mancabelli, L., Mangifesta, M., Lugli, G. A., Viappiani, A., Duranti, S., Turrone, F., Ossiprandi, M. C., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2019a). The impact of human-facilitated selection on the gut microbiota of domesticated mammals. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(9), fiz121. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz121>
- Alessandri, G., Milani, C., Mancabelli, L., Mangifesta, M., Lugli, G. A., Viappiani, A., Duranti, S., Turrone, F., Ossiprandi, M. C., Van Sinderen, D., Ventura, M. (2019b). Metagenomic dissection of the canine gut microbiota: insights into taxonomic, metabolic and nutritional features. *Environmental Microbiology*, 21(4), 1331-1343. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14540>
- Alessandri, G., Argentini, C., Milani, C., Turrone, F., Ossiprandi, M. C., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2020). Catching a glimpse of the bacterial gut community of companion animals: A canine and feline perspective. *Microbial Biotechnology*, 13(6), 1708-1732. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13656>
- Algya, K. M., Cross, T. L., Leuck, K. N., Kastner, M. E., Baba, T., Lye, L., de Godey, M. R. C., & Swanson, K. S. (2018). Apparent total-tract macronutrient digestibility, serum chemistry, urinalysis, and fecal characteristics, metabolites

and microbiota of adult dogs fed extruded, mildly cooked, and raw diets. *Journal of Animal Science*, 96(9), 3670–3683. <https://doi.org/10.1093/jas/sky235>

- Allaway, D., Haydock, R., Lonsdale, Z. N., Deusch, O., O’Flynn, C., & Hughes, K. R. (2020). Rapid reconstitution of the fecal microbiome after extended diet-induced changes indicates a stable gut microbiome in healthy adult dogs. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(13), e00562-20. <https://doi.org/10.1128/aem.00562-20>
- AlShawaqfeh, M. K., Wajid, B., Minamoto, Y., Markel, M., Lidbury, J. A., Steiner, J. M., Serpedin, E., Suchodolski, J. S. (2017). A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(11), fix136. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix136>
- Altafini, A., Roncada, P., Sonfack, G. M., Guerrini, A., Romeo, G. A., Fedrizzi, G., & Caprai, E. (2022). Occurrence of histamine in commercial cat foods under different storage conditions. *Veterinary Sciences*, 9(6), 270. <https://doi.org/10.3390/vetsci9060270>
- AOAC. (2010). *Official methods of analysis of Association Analytical Chemists International* (18th ed.). Washington, DC.
- AOAC. (2019). *Official methods of analysis of Association Analytical Chemists International* (21st ed.). Washington, DC.
- Apple, J. K., Boger, C. B., Brown, D. C., Maxwell, C. V., Friesen, K. G., Roberts, W. J., & Johnson, Z. B. (2003). Effect of feather meal on live animal performance and carcass quality and composition of growing-finishing swine. *Journal of animal science*, 81(1), 172-181. <https://doi.org/10.2527/2003.811172x>
- Arluke, A., & Rowan, A. (2020). *Underdogs: pets, people, and poverty*. University of Georgia Press.
- Azzollini, D., Wibisaphira, T., Lakemond, C. M. M., & Fogliano, V. (2019). Toward the design of insect-based meat analogue: The role of calcium and temperature in coagulation behavior of *Alphitobius diaperinus* proteins. *LWT*, 100, 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.037>

- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Huang, Z., Khan, M. I., Zhang, J., Li, J., Xiao, L., Al-Aama, J. Y., Zhang, D., Lee, Y. S., Kotowska, D., Colding, C., Tremaroli, V., Yin, Y., Bergman, S., Xu, X., Madsen, L., Kristiansen, K., Dahlgren, J., & Wang, J. (2015). Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host & Microbe*, *17*(5), 690-703. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004>
- Baker, D. H., Blitenthal, R. C., Boebel, K. P., Czarnecki, G. L., Southern, L. L., Willis, G. M. (1981). Protein-amino acid evaluation of steamed-processed feather meal. *Poultry Science* *60* (8), 1865-1872. <https://doi.org/10.3382/ps.0601865>
- Balouei, F., Armone, R., Stefanon, B., Randazzo, A., & Chiofalo, B. (2024). Long-term dietary intervention of the hydrolyzed feather meal on microbiota composition of adult female dogs. *Research in Veterinary Science*, *176*, 105340. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.105340>
- Balouei, F., Stefanon, B., Armone, R., Randazzo, A., & Chiofalo, B. (2025). Nutritional and microbiome effects of a partial substitution of poultry meat with hydrolyzed feather meal in dog diets. *Microorganisms*, *13*(1), 121. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13010121>
- Baquero, F., & Nombela, C. (2012). The microbiome as a human organ. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*, 2-4. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03916.x>
- Bardócz, S., Grant, G., Brown, D. S., Ralph, A., & Pusztai, A. (1993). Polyamines in food—implications for growth and health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *4*(2), 66-71. [https://doi.org/10.1016/0955-2863\(93\)90001-D](https://doi.org/10.1016/0955-2863(93)90001-D)
- Bastos, T. S., de Lima, D. C., Souza, C. M. M., Maiorka, A., de Oliveira, S. G., Bittencourt, L. C., & Félix, A. P. (2020). *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* reduce faecal protein catabolites concentration and odour in dogs. *BMC veterinary research*, *16*(1), 116-123. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02321-7>.

- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2014). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *arXiv preprint arXiv:1406.5823*. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1406.5823>
- Beetz, A., Uvnäs-Moberg, K., Julius, H., & Kotrschal, K. (2012). Psychosocial and psychophysiological effects of human-animal interactions: the possible role of oxytocin. *Frontiers in psychology*, 3, 234. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2012.00234>
- Bekebrede, A. F., Keijer, J., Gerrits, W. J., & Boer, V. C. D. (2020). The molecular and physiological effects of protein-derived polyamines in the intestine. *Nutrients*, 12(1), 197. <https://doi.org/10.3390/nu12010197>
- Bermingham, E. N., Maclean, P., Thomas, D. G., Cave, N. J., & Young, W. (2017). Key bacterial families (*Clostridiaceae*, *Erysipelotrichaceae* and *Bacteroidaceae*) are related to the digestion of protein and energy in dogs. *PeerJ*, 5, e3019. <https://doi.org/10.7717/peerj.3019>
- Bermingham, E. N., Young, W., Butowski, C. F., Moon, C. D., Maclean, P. H., Rosendale, D., Cave, N. J., & Thomas, D. G. (2018). The fecal microbiota in the domestic cat (*Felis catus*) is influenced by interactions between age and diet; a five-year longitudinal study. *Frontiers in microbiology*, 9, 1231. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01231>
- Berry, M. D. (2004). Mammalian central nervous system trace amines: Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators. *Journal of Neurochemistry*, 90(2), 257-271. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02501.x>
- Bertsch, A., & Coello, N. (2005). A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. *Bioresource technology*, 96(15), 1703-1708. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.12.026>
- Biguzzi, F. (2022). Valorizzazione delle risorse agro-zootecniche della filiera avicola in un'ottica circolare e sostenibile. In *Atti del Workshop "La sostenibilità delle filiere degli alimenti di origine animale: il tema dei sottoprodotti"* (pp. 12-14), Parma, 20 maggio 2022.
- Bik, E. M., Eckburg, P. B., Gill, S. R., Nelson, K. E., Purdom, E. A., François, F., Perez-Perez, G., Blaser, M. J., & Relman, D. A. (2006). Molecular analysis

of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(3), 732-737. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506655103>

- Blachier, F., Mariotti, F., Huneau, J. F., & Tomé, D. (2007). Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino acids*, 33(4), 547-562. <https://doi.org/10.1007/s00726-006-0477-9>
- Bolnick, D. I., Snowberg, L. K., Hirsch, P. E., Lauber, C. L., Org, E., Parks, B., Lusi, A. J., Knight, R., Caporaso, J. G., & Svanbäck, R. (2014). Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate gut microbiota. *Nature Communications*, 5, 4500. <https://doi.org/10.1038/ncomms5500>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al Ghalith, G. A., ... & Huttenhower, C. (2019). Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852-857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bordenstein, S. R., & Theis, K. R. (2015). Host biology in light of the microbiome: Ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biology*, 13(8), e1002226. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002226>
- Brody, T. (1999). *Nutritional Biochemistry*. San Diego, CA: Academic Press.
- Brooks, M. E., Kristensen, K., van Benthem, K. J., Magnusson, A., Berg, C. W., Nielsen, A., Skaug, H. J., Mächler, M., & Bolker, B. M. (2017). glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. *The R Journal*, 9(2), 378-400. <https://doi.org/10.32614/RJ-2017-066>
- Buchanan, R. L., Baker, R. C., Charlton, A. J., Riviere, J. E., & Standaert, R. F. (2011). Pet food safety: A shared concern. *British Journal of Nutrition*, 106(S1), S78-S84. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005034>
- Buttner, A. P., Thompson, B., Strasser, R., & Santo, J. (2015). Evidence for a synchronization of hormonal states between humans and dogs during competition. *Physiology & Behavior*, 147, 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.04.005>

- Cabel, M. C., Goodwin, T. L., & Waldroup, P. W. (1987). Reduction in abdominal fat content of broiler chickens by the addition of feather meal to finisher diets. *Poultry Science*, 66(10), 1644-1651. <https://doi.org/10.3382/ps.0661644>
- Campos, I., Matos, E., Marques, A., & Valente, L. M. (2017). Hydrolyzed feather meal as a partial fishmeal replacement in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 476, 152-159. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.024>
- Campos I., Valente L.M.P., Matos E., Marques P., Freire F., Araujo M. (2020). Life-cycle assessment of animal feed ingredients: Poultry fat, poultry by-product meal and hydrolyzed feather meal. *Journal of Cleaner Production*, 252, 119845. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119845>
- Carciofi, A. C., Pontieri, R., Ferreira, C. F., & Prada, F. (2006). Evaluation of diets with different protein sources for adult dogs. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35, 754-760. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000300017>
- Caron, P., Ferrero y de Loma-Osorio, G., Nabarro, D., Hainzelin, E., Guillou, M., Andersen, I., Astralaga, M., Beukeboom, M., Bickersteth, S., Bwalya, M., Caballero, P., Campbell, B. M., Divine, N., Fan, S., Frick, M., Friis, A., Gallagher, M., Halkin, J., Hanson, C., Lasbennes, F., Ribera, T., Rockstrom, J., Schupbach, M., Steer, A., Tutwiler, A., & Verburg, G. (2018). Food systems for sustainable development: proposals for a profound four-part transformation. *Agronomy for sustainable development*, 38(4), 41. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0519-1>
- Case, L. P., Daristotle, L., Hayek, M. G., & Raasch, M. F. (2011). *Canine and Feline Nutrition: A Resource for Companion Animal Professionals* (3rd ed.). Mosby Elsevier.
- Casula, G., & Cutting, S. M. (2002). Bacillus probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Applied and environmental microbiology*, 68(5), 2344-2352. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2344-2352.2002>
- Cavalari, A. P. D. M., Donzele, J. L., Viana, J. A., Abreu, M. L. T. D., Oliveira, A. L. S. D., Freitas, L. S. D., Carciofi, A. C. (2006). Determinação do valor nutritivo de alimentos energéticos e proteicos utilizados em rações para cães

- adultos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35, 1985-1991. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000700015>
- Cave, N. J. (2006). Hydrolyzed protein diets for dogs and cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 36(6), 1251-1268. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.08.008>
 - Cedrola, S. M. L., de Melo, A. C. N., Mazotto, A. M., Lins, U., Zingali, R. B., Rosado, A. S., Peixoto, R. S., & Vermelho, A. B. (2012). Keratinases and sulfide from *Bacillus subtilis* SLC to recycle feather waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 1259-1269. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0930-0>
 - Chakraborti, C. K. (2015). New-found link between microbiota and obesity. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 6(4), 110.
 - 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. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 124(2), 169-178. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(99\)00107-5](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00107-5)
 - Chiba, L. I., Ivey, H. W., Cummins, K. A., & Gamble, B. E. (1995). Effects of hydrolyzed feather meal as a source of extra dietary nitrogen on growth performance and carcass traits of finisher pigs. *Animal feed science and technology*, 53(1), 1-16. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)00739-V](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)00739-V)
 - Chiofalo, B., Cucinotta, S., Spanò, G., Carcione, G., Zena, R., & Di Rosa, A. R. (2016). Dall'ortofrutta di Sicilia nasce un alimento funzionale per il mercato del petfood: Quando lo spreco alimentare diventa risorsa. *Mangimi & Alimenti*, 3, 32-37.
 - Chiofalo, B., De Vita, G., Lo Presti, V., Cucinotta, S., Gaglio, G., Leone, F., & Di Rosa, A. R. (2019). Grain free diets for utility dogs during training work: Evaluation of the nutrient digestibility and faecal characteristics. *Animal Nutrition*, 5(3), 297-306. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.05.001>
 - Chiofalo, B., Armone, R., Oteri, M., & Di Rosa, A. R. (2024). Ruolo degli insetti nella sostenibilità del sistema alimentare. *NATURALI*, 24(235), 44-50

- Clune, S., Crossin, E., & Verghese, K. (2017). Systematic review of greenhouse gas emissions for different fresh food categories. *Journal of Cleaner Production*, 140, 766-783.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.04.082>
- Coelho, L. P., Kultima, J. R., Costea, P. I., Fournier, C., Pan, Y., Czarnecki-Maulden, G., Hayward, M. R., Forslund, S. K., Schmidt, T. S. B., Descombes, P., Jackson, J. R., Qinghong, L., Bork, P. (2018). Similarity of the dog and human gut microbiomes in gene content and response to diet. *Microbiome*, 6(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0450-3>
- Commissione Europea (2018). *Sviluppi di mercato e aspetti di valutazione delle politiche del settore delle proteine vegetali nell'UE*. Report finale.
- Corning, B., Copland, A. P., & Frye, J. W. (2018). The esophageal microbiome in health and disease. *Current gastroenterology reports*, 20(8), 39. <https://doi.org/10.1007/s11894-018-0642-9>
- 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. *Journal of animal science*, 85(12), 3285-3293. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-225>
- Cronin, M., Ventura, M., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2011). Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 149(1), 4-18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.019>
- Cummings, J. H., & Macfarlane, G. T. (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*, 70(6), 443-459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02739.x>
- Cupo, M. A., & Cartwright, A. L. (1991). The effect of feather meal on carcass composition and fat pad cellularity in broilers: Influence of the calorie: protein ratio of the diet. *Poultry Science*, 70(1), 153-159. <https://doi.org/10.3382/ps.0700153>
- d’Afflitto, M., Upadhyaya, A., Green, A., & Peiris, M. (2022). Association between sex hormone levels and gut microbiota composition and diversity—a

systematic review. *Journal of clinical gastroenterology*, 56(5), 384-392. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001676>

- D'Argenio, V., & Salvatore, F. (2015). The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica Chimica Acta*, 451, 97-102. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.003>
- Dai, Z., Wu, Z., Jia, S., & Wu, G. (2014). Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthaldialdehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 964, 116-127. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.03.025>
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559-563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- Davila, A. M., Blachier, F., Gotteland, M., Andriamihaja, M., Benetti, P. H., Sanz, Y., & Tomé, D. (2013). Re-print of "Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host". *Pharmacological research*, 69(1), 114-126. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.005>
- Davis, E. M. (2016). Gene sequence analyses of the healthy oral microbiome in humans and companion animals. *Journal of Veterinary Dentistry*, 33(2), 97-107. <https://doi.org/10.1177/0898756416657239>
- del Rio, B., Redruello, B., Fernandez, M., Martin, M. C., Ladero, V., & Alvarez, M. A. (2020). The biogenic amine tryptamine, unlike β -phenylethylamine, shows in vitro cytotoxicity at concentrations that have been found in foods. *Food Chemistry*, 331, 127303. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127303>
- Deloyer, P., Dandriofosse, G., Kok, N., & Delzenne, N. M. (2000). Dietary fructans modulate polyamine concentration in the cecum of rats. *The Journal of nutrition*, 130(10), 2456-2460. <https://doi.org/10.1093/jn/130.10.2456>

- Deng, P., & Swanson, K. S. (2015). Gut microbiota of humans, dogs and cats: Current knowledge and future opportunities and challenges. *British Journal of Nutrition*, 113(S1), S6-S17. <https://doi.org/10.1017/S0007114514002943>
- Derrien, M., Alvarez, A. S., & de Vos, W. M. (2019). The gut microbiota in the first decade of life. *Trends in Microbiology*, 27(12), 997-1010. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.08.001>
- Deschamps, C., Humbert, D., Zentek, J., Denis, S., Priymenko, N., Apper, E., & Blanquet-Diot, S. (2022). From Chihuahua to Saint-Bernard: how did digestion and microbiota evolve with dog sizes. *International Journal of Biological Sciences*, 18(13), 5086-5102. <https://doi.org/10.7150/ijbs.72770>
- Dewhirst, F. E., Klein, E. A., Bennett, M. L., Croft, J. M., Harris, S. J., & Marshall Jones, Z. V. (2015). The feline oral microbiome: A provisional 16S rRNA gene based taxonomy with full-length reference sequences. *Veterinary Microbiology*, 175(2-4), 294-303. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.11.019>
- Di Cerbo, A., Morales-Medina, J. C., Palmieri, B., Pezzuto, F., Cocco, R., Flores, G., & Iannitti, T. (2017). Functional foods in pet nutrition: Focus on dogs and cats. *Research in Veterinary Science*, 112, 161-166. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.020>
- Di Lalla, C. (2021). *La Professione Veterinaria*, 18(3), 10-11.
- Diether, N. E., & Willing, B. P. (2019). Microbial fermentation of dietary protein: an important factor in diet–microbe–host interaction. *Microorganisms*, 7(1), 19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010019>
- DIRETTIVA 2008/98/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 19 novembre 2008 relativa ai rifiuti e che abroga alcune direttive. GU L 312 del 22.11.2008.
- DIRETTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, L 276, pp. 33–79. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>
- Do, S., Phungviwatnikul, T., de Godoy, M. R., & Swanson, K. S. (2021). Nutrient digestibility and fecal characteristics, microbiota, and metabolites in

dogs fed human-grade foods. *Journal of animal science*, 99(2), skab028.
<https://doi.org/10.1093/jas/skab028>

- Dobermann, D., Swift, J. A., & Field, L. M. (2017). Opportunities and hurdles of edible insects for food and feed. *Nutrition Bulletin*, 42(4), 293-308.
<https://doi.org/10.1111/nbu.12291>
- Dossey, A. T., Tatum, J. T., & McGill, W. L. (2016). Modern insect-based food industry: current status, insect processing technology, and recommendations moving forward. In *Insects as sustainable food ingredients* (pp. 113-152). Academic Press.
- Duncan, S. H., Holtrop, G., Lobley, G. E., Calder, A. G., Stewart, C. S., & Flint, H. J. (2004). Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *British Journal of Nutrition*, 91(6), 915-923.
<https://doi.org/10.1079/BJN20041150>
- 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. *Journal of animal science*, 83(10), 2414-2422.
<https://doi.org/10.2527/2005.83102414x>
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9(10), 2393.
- Eissler, C. R., & Firman, J. D. (1996). Effects of feather meal on the performance of turkeys. *Journal of Applied Poultry Research*, 5(3), 246-253.
<https://doi.org/10.1093/japr/5.3.246>
- Ellen MacArthur Foundation. (2013). *Towards the circular economy: Economic and business rationale for an accelerated transition*.
<https://content.ellenmacarthurfoundation.org/m/4384c08da576329c/original/Towards-a-circular-economy-Business-rationale-for-an-accelerated-transition.pdf>
- El-Wahab, A. A., Zeiger, A. L., Chuppava, B., Visscher, C., & Kamphues, J. (2022). Effects of poultry by-products inclusion in dry food on nutrient

- digestibility and fecal quality in Beagle dogs. *PLoS One*, 17(11), e0276398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276398>
- Erdag, D., Merhan, O., & Yildiz, B. (2018). Biochemical and pharmacological properties of biogenic amines. *Biogenic amines*, 8, 1-14.
 - Eurostat (2024). *Spreco alimentare e prevenzione dello spreco alimentare – stime*. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Food_waste_and_food_waste_prevention_-_estimates
 - Evenepoel, P., Poesen, R., & Meijers, B. (2017). The gut-kidney axis. *Pediatric Nephrology*, 32(12), 2005-2014. <https://doi.org/10.1007/s00467-016-3527-x>
 - Fan, P., Song, P., Li, L., Huang, C., Chen, J., Yang, W., Qiao, S., Wu, G., Zhang, G., & Ma, X. (2017). Roles of biogenic amines in intestinal signaling. *Current Protein & Peptide Science*, 18(6), 532-540.
 - FAO. (2015). Food and Agriculture Organizations of the United Nations. *SAVE FOOD: Global Initiative on Food Loss and Food Waste Reduction*; Rome, Italy.
 - FAO. (2019). *Global Food Outlook – November 2019*. Retrieved from: <https://www.fao.org/news/story/en/item/1247138/icode/>
 - Fast, A. G., & Papoutsakis, E. T. (2012). Stoichiometric and energetic analyses of non-photosynthetic CO₂-fixation pathways to support synthetic biology strategies for production of fuels and chemicals. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 1(4), 380-395. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2012.07.005>
 - Feddern, V., Mazzuco, H., Fonseca, F. N., & De Lima, G. J. M. M. (2019). A review on biogenic amines in food and feed: Toxicological aspects, impact on health and control measures. *Animal Production Science*, 59(4), 608-618. <https://doi.org/10.1071/AN18076>
 - FEDIAF. (2018). *Guide to good practice for the manufacture of safe pet foods*.
 - FEDIAF. (2021). *Nutritional Guidelines: For Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs*. Brussels, Belgium: European Pet Food Industry Federation. Retrieved from: <https://europeanpetfood.org/wp-content/uploads/2022/03/Updated-Nutritional-Guidelines.pdf>

- Ferrareze, P. A. G., Correa, A. P. F., & Brandelli, A. (2016). Purification and characterization of a keratinolytic protease produced by probiotic *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 7, 102-109. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.05.009>
- Fiksel, J., Eason, T., & Frederickson, H. (2012). A framework for sustainability indicators at EPA. U.S. Environmental Protection Agency. Office of Research and Development National Risk Management Research Laboratory, Sustainable Technology Division. Retrieved from: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-10/documents/framework-for-sustainability-indicators-at-epa.pdf>
- Flickinger, E. A., Schreijen, E. M. W. C., Patil, A. R., Hussein, H. S., Grieshop, C. M., Merchen, N. R., & Fahey Jr, G. C. (2003). Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. *Journal of Animal Science*, 81(8), 2008-2018. <https://doi.org/10.2527/2003.8182008x>
- Friedmann, E., & Thomas, S. (1995). Pet ownership, social support, and one-year survival after acute myocardial infarction in the Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST). *The American Journal of Cardiology*, 76(17), 1213-1217. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(99\)80343-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(99)80343-9)
- Furst, G. A. (2006). National survey of prison-based animal programs. *Prison Journal*, 86(4), 407–430. <https://doi.org/10.1177/0032885506292551>
- GA Pet Food Partners. (2021). *Idrolisi proteica HDP*. Retrieved from: <https://ga-petfoodpartners.it/idrolisi-proteica-hdp/>
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>
- Girio, T. M. S., Filho, A. N., Junior, O. D. R., Amaral, L. A., & Girio, R. J. S. (2012). Microbiological quality of dog feed sold in sealed packages and in bulk. *Ars Veterinaria*, 28, 036-040.
- Gong, M., Aguirre, A. M., & Bassi, A. (2016). Technical issues related to characterization, extraction, recovery, and purification of proteins from

- different waste sources. *Protein Byproducts*, 89-106. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802391-4.00005-7>
- Gooding C.H. (2013). *Life Cycle Assessment of Rendering and Rendered Products*. Fats and Proteins Research Foundation (FPRF), USA.
 - Gorkiewicz, G., & Moschen, A. (2018). Gut microbiome: A new player in gastrointestinal disease. *Virchows Archiv*, 472(1), 159-172. <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2277-x>
 - Grazziotin, A., Pimentel, F. A., De Jong, E. V., & Brandelli, A. (2006). Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Animal feed science and technology*, 126(1-2), 135-144. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.06.002>
 - Griffin, M., Sobal, J., & Lyson, T. A. (2009). An analysis of a community food waste stream. *Agriculture and human values*, 26(1), 67-81. <https://doi.org/10.1007/s10460-008-9178-1>
 - Grossmann, L., & Weiss, J. (2021). Alternative protein sources as technofunctional food ingredients. *Annual Review of Food Science and Technology*, 12(1), 93-117. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-062520-093642>
 - Guard, B. C., Mila, H., Steiner, J. M., Mariani, C., Suchodolski, J. S., & Chastant-Maillard, S. (2017). Characterization of the fecal microbiome during neonatal and early pediatric development in puppies. *PLOS ONE*, 12(4), e0175718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175718>
 - Hamer, H. M., Jonkers, D. M. A. E., Venema, K., Vanhoutvin, S. A. L. W., Troost, F. J., & Brummer, R. J. (2008). The role of butyrate on colonic function. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 27(2), 104-119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x>
 - Han, G. G., Lee, J. Y., Jin, G. D., Park, J., Choi, Y. H., Kang, S. K., Chae, B. J., Kim B. E., & Choi, Y. J. (2018). Tracing of the fecal microbiota of commercial pigs at five growth stages from birth to shipment. *Scientific reports*, 8(1), 6012. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24508-7>

- Hand M. S., Thatcher, C. D., Remillard, R. L., Roudebush, p., & Novotny, B. J. (2010). *Small Animal Clinical Nutrition, 5th ed.*, Mark Morris Institute, p. 618
- Hankel, J., El-Wahab, A. A., Grone, R., Keller, B., Galvez, E., Strowig, T., & Visscher, C. (2020). Faecal microbiota of dogs offered a vegetarian diet with or without the supplementation of feather meal and either cornmeal, rye or fermented rye: A preliminary study. *Microorganisms*, 8(9), 1363. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091363>
- Harvey, R., & Hall, E. (2009). Alergia/intolerância alimentar. *Vet Focus*, 19, 36-41.
- Hasan, N., & Yang, H. (2019). Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ*, 7, e7502. <https://doi.org/10.7717/peerj.7502>
- Herstad, K. M., Gajardo, K., Bakke, A. M., Moe, L., Ludvigsen, J., & Rudi, K. (2017). A diet change from dry food to beef induces reversible changes on the faecal microbiota in healthy, adult client-owned dogs. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 147. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1073-9>
- Higuera, C., Sainz, Á., García-Sancho, M., Rodríguez-Franco, F., & Rey, A. I. (2024). Faecal short-chain, long-chain, and branched-chain fatty acids as markers of different chronic inflammatory enteropathies in dogs. *Animals*, 14(12), 1825. <https://doi.org/10.3390/ani14121825>.
- Ho, J., Hussain, S., & Sparagano, O. (2021). Did the COVID-19 pandemic spark a public interest in pet adoption? *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 647308. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.647308>
- Hoffmann, A. R., Proctor, L. M., Surette, M. G., & Suchodolski, J. S. (2016). The microbiome: The trillions of microorganisms that maintain health and cause disease in humans and companion animals. *Veterinary Pathology*, 53(1), 10-21. <https://doi.org/10.1177/0300985815595517>
- Holmes, A. J., Chew, Y. V., Colakoglu, F., Cliff, J. B., Klaassens, E., Read, M. N., Solon-Biet, S., McMahon, A. C., Cogger, V. C., Ruohonen, K., Raubenheimer, D., Le Couteur, D. G., & Simpson, S. J. (2017). Diet-microbiome interactions in health are controlled by intestinal nitrogen source

- constraints. *Cell Metabolism*, 25(1), 140-151. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.10.021>
- Honneffer, J. B., Minamoto, Y., & Suchodolski, J. S. (2014). Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *World Journal of Gastroenterology*, 20(44), 16489-16497. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i44.16489>
 - Honneffer, J. B., Steiner, J. M., Lidbury, J. A., & Suchodolski, J. S. (2017). Variation of the microbiota and metabolome along the canine gastrointestinal tract. *Metabolomics*, 13(3), 26. <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1165-3>
 - Hou, Y., Wu, Z., Dai, Z., Wang, G., & Wu, G. (2022). Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Bioactive Peptides from Food*, 209-232. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0153-9>
 - Høverstad, T., & Midtvedt, T. (1986). Short-chain fatty acids in germfree mice and rats. *The Journal of Nutrition*, 116(9), 1772-1776. <https://doi.org/10.1093/jn/116.9.1772>
 - Hsu, C., Marx, F., Guldenpfennig, R., Valizadegan, N., & de Godoy, M. R. (2024). The effects of hydrolyzed protein on macronutrient digestibility, fecal metabolites and microbiota, oxidative stress and inflammatory biomarkers, and skin and coat quality in adult dogs. *Journal of animal science*, 102, skae057. <https://doi.org/10.1093/jas/skae057>
 - Hughes, R., Magee, E. A. M., & Bingham, S. (2000). Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. *Current issues in intestinal microbiology*, 1(2), 51-58.
 - Hussein, H. S., Flickinger, E. A., & Fahey Jr, G. C. (1999). Petfood applications of inulin and oligofructose. *The Journal of nutrition*, 129(7), 1454S-1456S. <https://doi.org/10.1093/jn/129.7.1454S>
 - Hussein, H. S., & Sunvold, G. D. (2000). Dietary strategies to decrease dog and cat fecal odor components. In *Recent Advances in Canine and Feline Nutrition* (Vol. 3, pp. 153–168). Iams Nutrition Symposium Proceedings.
 - Jagadeesan, Y., Meenakshisundaram, S., Suthakaran, P., & Balaiah, A. (2024). A scientific version of understanding “Why did the chickens cross the road”?

- A guided journey through *Bacillus* spp. towards sustainable agriculture, circular economy and biofortification. *Environmental Research*, 244, 117907. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117907>
- Jha, A. R., Shmalberg, J., Tanprasertsuk, J., Perry, L., Massey, D., & Honake, R. W. (2020). Characterization of gut microbiomes of household pets in the United States using a direct-to-consumer approach. *PLOS ONE*, 15(2), e0227289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227289>
 - Jiménez, E., Marín, M., Martín, R., Odriozola, J. M., Olivares, M., Xaus, J., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology*, 159(3), 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.007>
 - Kaminski, J., Brauer, J., Call, J., & Tomasello, M. (2009). Domestic dogs are sensitive to a human's perspective. *Behaviour*, 146(7), 979-998. <https://doi.org/10.1163/156853909X413458>
 - Kazimierska, K., Biel, W., Witkiewicz, R., Karakulska, J., & Stachurska, X. (2021). Evaluation of nutritional value and microbiological safety in commercial dog food. *Veterinary Research Communications*, 45(2), 111-128. <https://doi.org/10.1007/s11259-021-09791-6>
 - Kępińska-Pacelik, J., & Biel, W. (2021). Microbiological hazards in dry dog chews and feeds. *Animals*, 11(3), 631. <https://doi.org/10.3390/ani11030631>
 - Kerr, K. R., Morris, C. L., Burke, S. L., & Swanson, K. S. (2013). Influence of dietary fiber type and amount on energy and nutrient digestibility, fecal characteristics, and fecal fermentative end-product concentrations in captive exotic felids fed a raw beef-based diet. *Journal of Animal Science*, 91(5), 2199-2210. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5702>
 - Kilburn, L. R., Allenspach, K., Jergens, A. E., Bourgois-Mochel, A., Mochel, J. P., & Serao, M. C. R. (2020). Apparent total tract digestibility, fecal characteristics, and blood parameters of healthy adult dogs fed high-fat diets. *Journal of animal science*, 98(3), skaa043. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa043>
 - Kim, W. K., & Patterson, P. H. (2000). Nutritional value of enzyme-or sodium hydroxide-treated feathers from dead hens. *Poultry Science*, 79(4), 528-534. <https://doi.org/10.1093/ps/79.4.528>

- Kim, J., An, J. U., Kim, W., Lee, S., & Cho, S. (2017). Differences in the gut microbiota of dogs (*Canis lupus familiaris*) fed a natural diet or a commercial feed revealed by the Illumina MiSeq platform. *Gut Pathogens*, 9(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0218-5>
- Kim, E. T., Lee, S. J., Kim, T. Y., Lee, H. G., Atikur, R. M., Gu, B. H., ... & Kim, M. H. (2021). Dynamic changes in fecal microbial communities of neonatal dairy calves by aging and diarrhea. *Animals*, 11(4), 1113. <https://doi.org/10.3390/ani11041113>
- Korhonen, J., Honkasalo, A., & Seppälä, J. (2018). Circular economy: the concept and its limitations. *Ecological economics*, 143, 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2017.06.041>
- Kubinyi, E., Rhali, S. B., Sándor, S., Szabó, A., & Felföldi, T. (2020). Gut microbiome composition is associated with age and memory performance in pet dogs. *Animals*, 10(9), 1488. <https://doi.org/10.3390/ani10091488>
- Kuperman, A. A., Zimmerman, A., Hamadia, S., Ziv, O., Gurevich, V., Fichtman, B., Gavert, N., Straussman, R., Rechnitzer, H., Barzilay, M., Shvalb, S., Bornstein, J., Ben-Shachar, I., Yagel, S., Haviv, I., & Koren, O. (2019). Deep microbial analysis of multiple placentas shows no evidence for a placental microbiome. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 127(2), 159-169. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.15896>
- Ladero, V., Calles-Enriquez, M., Fernandez, M., & Alvarez, M. A. (2010). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6(2), 145-156. <https://doi.org/10.2174/157340110791233256>
- Laflamme, D. R. P. C. (1997). Developmental and validation of a body condition score system for dogs.
- Lazzi, C. (2022). La fermentazione come strategia per la valorizzazione dei sottoprodotti. In *Atti del Workshop “La sostenibilità delle filiere degli alimenti di origine animale: il tema dei sottoprodotti”* (pp. 5-8).
- Le Roux, M. C., & Kemp, R. (2009). Effect of a companion dog on depression and anxiety levels of elderly residents in a long-term care facility. *Psychogeriatrics*, 9, 23-26. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8301.2009.00268.x>

- Learey, J. J., Crawford-Clark, S., Bowen, B. J., Barrow, C. J., & Adcock, J. L. (2018). Detection of biogenic amines in pet food ingredients by RP-HPLC with automated dansyl chloride derivatization. *Journal of separation science*, *41*(24), 4430-4436. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800455>
- Lee, T. Y., Lee, Y. S., Yeh, R. H., Chen, K. H., & Chen, K. L. (2022). *Bacillus amyloliquefaciens* CU33 fermented feather meal-soybean meal product improves the intestinal morphology to promote the growth performance of broilers. *Poultry Science*, *101*(9), 102027. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102027>
- Leiva, A., Molina, A., Redondo-Solano, M., Artavia, G., Rojas-Bogantes, L., & Granados-Chinchilla, F. (2019). Pet food quality assurance and safety and quality assurance survey within the Costa Rican pet food industry. *Animals*, *9*(11), 980. <https://doi.org/10.3390/ani9110980>
- Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., Schlegel, M. L., Tucker, T. A., Schrenzel, M. D., Knight, R., & Gordon, J. I. (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, *320*(5883), 1647-1651. <https://doi.org/10.1126/science.1155725>
- Li, B., & Lu, S. (2020). The importance of amine-degrading enzymes on the biogenic amine degradation in fermented foods: A review. *Process Biochemistry*, *99*, 331-339. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.09.012>
- Löser, C., Eisel, A., Harms, D., & Fölsch, U. R. (1999). Dietary polyamines are essential luminal growth factors for small intestinal and colonic mucosal growth and development. *Gut*, *44*(1), 12-16. <https://doi.org/10.1136/gut.44.1.12>
- Louis, P., Duncan, S. H., McCrae, S. I., Millar, J., Jackson, M. S., & Flint, H. J. (2004). Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *Journal of bacteriology*, *186*(7), 2099-2106. <https://doi.org/10.1128/jb.186.7.2099-2106.2004>
- Lowry, L., & Ryan, A. (1993). Recreation is not a luxury. *Elder Care*, *5*, 24-26. <https://doi.org/10.7748/elc.5.6.24.s30>

- Luong, V. B., & Payne, C. G. (1977). Hydrolysed feather protein as a source of amino acids for laying hens. *British Poultry Science*, 18(5), 523-526. <https://doi.org/10.1080/00071667708416396>.
- MacAlpine, R., & Payne, C. G. (1977). Hydrolysed feather protein as a source of amino acids for broilers. *British Poultry Science*, 18(3), 265-273. <https://doi.org/10.1080/00071667708416362>
- Macfarlane, G. T., Allison, C., Gibson, S. A. W., & Cummings, J. H. (1988). Contribution of the microflora to proteolysis in the human large intestine. *Journal of Applied Bacteriology*, 64(1), 37-46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb02427.x>
- Macfarlane, G.T., Cummings, J.H. (1991). The colonic flora, fermentation, and large bowel digestive function, in: Phillips, S.F., Pemberton, J.H., Shorter, R.G. (Eds.), *The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease*. Raven Press Ltd, New York, pp. 51-92.
- Macfarlane, G. T., Gibson, G. R., Beatty, E., & 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 microbiology ecology*, 10(2), 81-88. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05764.x>.
- Macfarlane, S., & Macfarlane, G. T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 67-72. <https://doi.org/10.1079/PNS2002207>
- Machado, G. S., Correa, A. P. F., Pires, P. G. D. S., Marconatto, L., Brandelli, A., Kessler, A. D. M., & Trevizan, L. (2021). Determination of the nutritional value of diet containing *Bacillus subtilis* hydrolyzed feather meal in adult dogs. *Animals*, 11(12), 3553. <https://doi.org/10.3390/ani11123553>
- Mahowald, M. A., Rey, F. E., Seedorf, H., Turnbaugh, P. J., Fulton, R. S., Wollam, A., Shah, N., Wang, C., Magrini, V., Wilson, R. K., Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Henrissant, B., Crock, L. W., Russell, A., Verberkmoes, N. C., Hettich, R. L., & Gordon, J. I. (2009). Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(14), 5859-5864.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0901529106>

- Makki, K., Deehan, E. C., Walter, J., & Bäckhed, F. (2018). The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. *Cell host & microbe*, 23(6), 705-715. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.012>
- Mancabelli, L., Tarracchini, C., Milani, C., Lugli, G. A., Fontana, F., Turrone, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2020). Multi-population cohort meta-analysis of human intestinal microbiota in early life reveals the existence of infant community state types (ICSTs). *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 2480-2493.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.028>
- Mancino, W., Duranti, S., Mancabelli, L., Longhi, G., Anzalone, R., Milani, C., & Turrone, F. (2019). Bifidobacterial transfer from mother to child as examined by an animal model. *Microorganisms*, 7(9), 293.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7090293>
- Maria, A. P. J., Ayane, L., Putarov, T. C., Loureiro, B. A., Neto, B. P., Casagrande, M. F., Gomes, M. O. S., Gloria, A. B. A., & Carciofi, A. C. (2017). The effect of age and carbohydrate and protein sources on digestibility, fecal microbiota, fermentation products, fecal IgA, and immunological blood parameters in dogs. *Journal of animal science*, 95(6), 2452-2466.
<https://doi.org/10.2527/jas.2016.1302>
- Markle, J. G., Frank, D. N., Mortin-Toth, S., Robertson, C. E., Feazel, L. M., Rolle-Kampczyk, U., Von Bergen, M., McCoy, Kathy D., Macpherson, A. J. & Danska, J. S. (2013). Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science*, 339(6123), 1084-1088.
<https://doi.org/10.1126/science.1233521>
- Martínez-López, L. M., Pepper, A., Pilla, R., Woodward, A. P., Suchodolski, J. S., & Mansfield, C. (2021). Effect of sequentially fed high protein, hydrolyzed protein, and high fiber diets on the fecal microbiota of healthy dogs: a cross-over study. *Animal microbiome*, 3(1), 42.
<https://doi.org/10.1186/s42523-021-00101-8>

- Martuscelli, M., Esposito, L., & Mastrocola, D. (2021). Biogenic amines' content in safe and quality food. *Foods*, 10(1), 100. <https://doi.org/10.3390/foods10010100>
- Meyer, H., Zentek, J., Habernoll, H., & Maskell, I. (1999). Digestibility and compatibility of mixed diets and faecal consistency in different breeds of dog. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 46(3), 155-166. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.1999.00201.x>
- Middelbos, I. S., Vester Boler, B. M., Qu, A., White, B. A., Swanson, K. S., & Fahey Jr, 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(3), e9768. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009768>
- Miller, T. L., & Wolin, M. J. (1996). Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Applied and environmental microbiology*, 62(5), 1589-1592. <https://doi.org/10.1128/aem.62.5.1589-1592.1996>
- Miller, E. L. (2004). Protein nutrition requirements of farmed livestock and dietary supply.
- Minamoto, Y., Minamoto, T., Isaiah, A., Sattasathuchana, P., Buono, A., Rangachari, V. R., McNeely, I. H., Lidbury, J., Steiner, J. M., & Suchodolski, J. S. (2019). Fecal short-chain fatty acid concentrations and dysbiosis in dogs with chronic enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(4), 1608-1618. <https://doi.org/10.1111/jvim.15520>
- Moffa, S., Mezza, T., Cefalo, C. M., Cinti, F., Impronta, F., Sorice, G. P., Santoro, A., Di Giuseppe, G., Pontecorvi, A., & Giaccari, A. (2019). The interplay between immune system and microbiota in diabetes. *Mediators of inflammation*, 2019(1), 9367404. <https://doi.org/10.1155/2019/9367404>
- Mondo, E., Marliani, G., Accorsi, P. A., Cocchi, M., & Di Leone, A. (2019). Role of gut microbiota in dog and cat's health and diseases. *Open veterinary journal*, 9(3), 253-258. <https://doi.org/10.4314/ovj.v9i3.10>
- Montegiove, N., Calzoni, E., Cesaretti, A., Alabed, H., Pellegrino, R. M., Emiliani, C., Pellegrino, A., & Leonardi, L. (2020). Comprehensive evaluation

- of lipidic content in dry pet food raw materials: Comparison between fresh meats and meat meals. *Scientific Bulletin Series F Biotechnology*, 24, 122-129.
- Montegiove, N., Calzoni, E., Cesaretti, A., Pellegrino, R. M., Emiliani, C., Pellegrino, A., & Leonardi, L. (2021). Soluble protein content assessment in dry pet food raw materials: Comparison between fresh meat and meat meal formulations. *Scientific Bulletin Series F Biotechnology*, 25, 54-60.
 - Montegiove, N., Leonardi, L., Cesaretti, A., Pellegrino, R. M., Pellegrino, A., Emiliani, C., & Calzoni, E. (2023). Biogenic amine content analysis of three chicken-based dry pet food formulations. *Animals*, 13(12), 1945. <https://doi.org/10.3390/ani13121945>
 - Moon, C. D., Young, W., Maclean, P. H., Cookson, A. L., & Bermingham, E. N. (2018). Metagenomic insights into the roles of Proteobacteria in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats. *Microbiologyopen*, 7(5), e00677. <https://doi.org/10.1002/mbo3.677>
 - Moran Jr, E. T., Summers, J. D., & Slinger, S. J. (1966). Keratin as a source of protein for the growing chick: 1. Amino acid imbalance as the cause for inferior performance of feather meal and the implication of disulfide bonding in raw feathers as the reason for poor digestibility. *Poultry Science*, 45(6), 1257-1266. <https://doi.org/10.3382/ps.0451257>
 - Mordor Intelligence. (2023). *Feather Meal Market Report – Trends and Forecasts*. Retrieved from: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/feather-meal-market>
 - Mori, A., Goto, A., Kibe, R., Oda, H., Kataoka, Y., & Sako, T. (2019). Comparison of the effects of four commercially available prescription diet regimens on the fecal microbiome in healthy dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 81(12), 1783–1790. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0055>
 - Moritz, J. S., & Latshaw, J. D. (2001). Indicators of nutritional value of hydrolyzed feather meal. *Poultry Science*, 80(1), 79-86. <https://doi.org/10.1093/ps/80.1.79>
 - Mouillé, B., Morel, E., Robert, V., Guihot-Joubrel, G., & Blachier, F. (1999). Metabolic capacity for L-citrulline synthesis from ammonia in rat isolated

- colonocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1427(3), 401-407. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(99\)00045-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00045-8)
- Moxham, G. (2001). Waltham feces scoring system-A tool for veterinarians and pet owners: How does your pet rate. *Waltham focus*, 11(2), 24-25.
 - Murray, S. M., Patil, A. R., Fahey Jr, G. C., Merchen, N. R., & Hughes, D. M. (1997). Raw and rendered animal by-products as ingredients in dog diets. *Journal of animal science*, 75(9), 2497-2505. <https://doi.org/10.2527/1997.7592497x>
 - Nascente, P.S.; Xavier, M.O.; Rosa, C.S.; Souza, L.L.; Meireles, M.C.; Mello, J.R.B. (2006). Hipersensibilidade Alimentar em Cães e Gatos. *Revista Clínica Veterinária*, 64, 60-66.
 - 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. *Journal of Animal Science*, 90(8), 2570-2580. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4112>
 - Nishino, K., Nishida, A., Inoue, R., Kawada, Y., Ohno, M., Sakai, S., Inatomi, O., Bamba, S., Sugimoto, M., Kawahara, M. & Andoh, A. (2018). Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Journal of gastroenterology*, 53(1), 95-106. <https://doi.org/10.1007/s00535-017-1384-4>
 - Nyangale, E. P., Mottram, D. S., & Gibson, G. R. (2012). Gut microbial activity, implications for health and disease: The potential role of metabolite analysis. *Journal of Proteome Research*, 11(12), 5573-5585. <https://doi.org/10.1021/pr300637d>
 - Org, E., Mehrabian, M., Parks, B. W., Shipkova, P., Liu, X., Drake, T. A., & Lusi, A. J. (2016). Sex differences and hormonal effects on gut microbiota composition in mice. *Gut microbes*, 7(4), 313-322. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1203502>
 - Osservatorio Immagino. (2024). *Le etichette dei prodotti raccontano i consumi degli italiani*.

- Oteri, M., Di Rosa, A. R., Lo Presti, V., Giarratana, F., Toscano, G., & Chiofalo, B. (2021). Black soldier fly larvae meal as alternative to fish meal for aquaculture feed. *Sustainability*, 13(10), 5447. <https://doi.org/10.3390/su13105447>
- Pacheco, G. F. E., Pezzali, J. G., Kessler, A. D. M., & Trevizan, L. (2016). Inclusion of exogenous enzymes to feathers during processing on the digestible energy content of feather meal for adult dogs. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 45(6), 288-294. <https://doi.org/10.1590/S1806-92902016000600002>
- Pan, M., Sung, C. H., Pilla, R., Suchodolski, J. S., & Summers, S. C. (2025). Effect of Wheat Dextrin Fiber on the Fecal Microbiome and Short-Chain Fatty Acid Concentrations in Dogs: Randomized, Single-Blinded, Parallel-Group Clinical Trial. *Pets* 2(1), 3. <https://doi.org/10.3390/pets2010003>
- Pasupuleti, V. K., & Braun, S. (2010). State of the art manufacturing of protein hydrolysates. *Protein hydrolysates in biotechnology*, 11-32.
- Payne, E., DeAraugo, J., Bennett, P., & McGreevy, P. (2016). Exploring the existence and potential underpinnings of dog-human and horse-human attachment bonds. *Behavioural Processes*, 125, 114-121.
- Pereira, A. G., Fraga-Corral, M., García-Oliveira, P., Otero, P., Soria-López, A., Cassani, L., Cao, H., Xiao, J., Prieto, M. A., & Simal-Gándara, J. (2022). Single-cell proteins obtained by circular economy intended as a feed ingredient in aquaculture. *Foods*, 11(18), 2831. <https://doi.org/10.3390/foods11182831>
- Pereira, A. M., Pinna, C., Biagi, G., Stefanelli, C., Maia, M. R., Matos, E., Segundo, M. A., Fonseca, A. J. M., & Cabrita, A. R. J. (2020). Supplemental selenium source on gut health: Insights on fecal microbiome and fermentation products of growing puppies. *FEMS microbiology ecology*, 96(11), fiae212. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae212>
- Pérez-Muñoz, M. E., Arrieta, M. C., Ramer-Tait, A. E., & Walter, J. (2017). A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: Implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*, 5(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0268-4>
- Pibot, P., Biourge, V., & Elliott, D. (2006). *Encyclopedia of canine clinical nutrition*.

- Piccioni, M., Cevolani, D., & Rizzitelli, N. (1989). *Dizionario degli alimenti per il bestiame*. Bologna: Edagricole.
- Pilla, R., & Suchodolski, J. S. (2020). The role of the canine gut microbiome and metabolome in health and gastrointestinal disease. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 498. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00498>
- Pilla, R., Suchodolski, J. S. (2021). The gut microbiome of dogs and cats, and the influence of diet. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 51(3), 605-621. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2021.01.002>
- Pinto, C. F. D., de Oliveira, B. B., Bortolo, M., Guldenpfennig, R., Marx, F. R., & Trevizan, L. (2022). Hydrolyzed chicken liver used as single source of animal protein in diet and its effect on cytokines, immunoglobulins, and fecal microbiota profile of adult dogs. *PLoS One*, 17(7), e0271932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271932>
- Pinto, C. F. D., Monteiro, C. F. C., Bortolo, M., Marx, F. R., Model, J. F. A., Vinagre, A. S., & Trevizan, L. (2023). Effects of diets based on hydrolyzed chicken liver and different protein concentrations on the formation and deamination of biogenic amines and total antioxidant capacity of dogs. *Animals*, 13(16), 2578. <https://doi.org/10.3390/ani13162578>
- Plumb, G. W., Mills, E. C., Tatton, M. J., D'Ursel, C. C., Lambert, N., & Morgan, M. R. (1994). Effect of thermal and proteolytic processing on glycinin, the 11S globulin of soy (Glycine max): a study utilizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(3), 834-840.
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes & nutrition*, 6(3), 285-306. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>
- Possemiers, S., Bolca, S., Verstraete, W., & Heyerick, A. (2011). The intestinal microbiome: a separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals. *Fitoterapia*, 82(1), 53-66. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.07.012>
- Powell, L., Chia, D., McGreevy, P., Podberscek, A. L., Edwards, K. M., Neilly, B., Guastella, A. J., Lee, V., & Stamatakis, E. (2018). Expectations for dog

ownership: Perceived physical, mental and psychosocial health consequences among prospective adopters. *PLoS ONE*, *13*(7), e0200276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200276>

- Powell, L., Edwards, K. M., McGreevy, P., Bauman, A., Podberscek, A., Neilly, B., Sherrington, C., & Stamatakis, E. (2019). Companion dog acquisition and mental well-being: A community-based three-arm controlled study. *BMC Public Health*, *19*(1), 1428. <https://doi.org/10.1186/s12889-019-7750-2>
- Preti, R., Antonelli, M. L., Bernacchia, R., & Vinci, G. (2015). Fast determination of biogenic amines in beverages by a core-shell particle column. *Food Chemistry*, *187*, 555-562. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.075>
- Proctor, D. M., & Relman, D. A. (2017). The landscape ecology and microbiota of the human nose, mouth, and throat. *Cell host & microbe*, *21*(4), 421-432. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.011>
- Qi, J., Li, X., Zhang, W., Wang, H., Zhou, G., & Xu, X. (2018). Influence of stewing time on the texture, ultrastructure and in vitro digestibility of meat from the yellow-feathered chicken breed. *Animal Science Journal*, *89*(2), 474-482. <https://doi.org/10.1111/asj.12929>
- Qiu, J., Wilkens, C., Barrett, K., & Meyer, A. S. (2020). Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function. *Biotechnology advances*, *44*, 107607. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107607>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, *41*(D1), D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rackaityte, E., Halkias, J., Fukui, E., Mendoza, V. F., Hayzelden, C., Crawford, E., Fujimura, K. E., Burt, T. D., & Lynch, S. V. (2020). Viable bacterial colonization is highly limited in the human intestine in utero. *Nature medicine*, *26*(4), 599-607. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0761-3>

- Ramirez A.D., Humphries A.C., Woodgate S.L., Wilkinson R.G. (2012). Greenhouse gas life cycle assessment of products arising from the rendering of mammalian animal by-products in the UK. *Environmental Science & Technology*, 46(1), 447–453. <https://doi.org/10.1021/es201983t>
- Rapporto Assalco - Zoomark. (2025). *Alimentazione e cura degli animali da compagnia: Pet come elemento evolutivo della società: relazione, integrazione e diritti* (XVIII ed.). Associazione Nazionale Imprese per l'Alimentazione e la Cura degli Animali da Compagnia.
- REGOLAMENTO (CE) n. 1069/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 21 ottobre 2009 recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale e ai prodotti derivati non destinati al consumo umano e che abroga il regolamento (CE) n. 1774/2002 (regolamento sui sottoprodotti di origine animale) *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, L 300, pp. 1–33.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1069>
- REGOLAMENTO (CE) N. 767/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 13 luglio 2009 sull'immissione sul mercato e sull'uso dei mangimi, che modifica il regolamento (CE) n. 1831/2003 e che abroga le direttive 79/373/CEE del Consiglio, 80/511/CEE della Commissione, 82/471/CEE del Consiglio, 83/228/CEE del Consiglio, 93/74/CEE del Consiglio, 93/113/CE del Consiglio e 96/25/CE del Consiglio e la decisione 2004/217/CE della Commissione. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, L 229, pp. 1–28. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/767/oj>
- Reijnders, L., & Soret, S. (2003). Quantification of the environmental impact of different dietary protein choices. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3), 664S-668S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.3.664S>
- Ritter, A. C., Paula, A., Correa, F., Veras, F. F., & Brandelli, A. (2018). Characterization of *Bacillus subtilis* available as probiotics. *Journal of Microbiology Research*, 8(2), 23-32. <https://doi.org/10.5923/j.microbiology.20180802.01>

- Roswall, J., Olsson, L. M., Kovatcheva-Datchary, P., Nilsson, S., Tremaroli, V., Simon, M. C., Kiilerich, P., Akrami, R., Krämer, M., Uhlén, M., Gummesson, A., Kristiansen, K., Dahlgren, J., & Bäckhed, F. (2021). Developmental trajectory of the healthy human gut microbiota during the first 5 years of life. *Cell host & microbe*, 29(5), 765-776. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.02.021>
- Ruiz-Capillas, C., & Herrero, A. M. (2019). Impact of biogenic amines on food quality and safety. *Foods*, 8 (2), 62. <https://doi.org/10.3390/foods8020062>
- Ryan, M. G., Storey, A. E., Anderson, R. E., & Walsh, C. J. (2019). Physiological indicators of attachment in domestic dogs (*Canis familiaris*) and their owners in the strange situation test. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13, 162. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00162>
- Salonen, A., & de Vos, W. M. (2014). Impact of diet on human intestinal microbiota and health. *Annual review of food science and technology*, 5(1), 239-262. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182554>
- Sánchez-Pérez, S., Comas-Basté, O., Costa-Catala, J., Iduriaga-Platero, I., Veciana-Nogués, M. T., Vidal-Carou, M. C., & Latorre-Moratalla, M. L. (2022). The rate of histamine degradation by diamine oxidase is compromised by other biogenic amines. *Frontiers in Nutrition*, 9, 897028. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.897028>
- Sandri, M., & Meineri, G. (2021). Il microbiota intestinale e il suo ruolo nella salute del cane e del gatto. In G. Biagi, B. Chiofalo, M. I. Cutrignelli, A. De Angelis, E. Fusi, G. Meineri, L. Prola, R. Ricci, & M. Sandri (Eds.), *Nutrizione e alimentazione del cane e del gatto* (pp. 61-64). Edagricole.
- Sandri, M., Dal Monego, S., Conte, G., Sgorlon, S., & Stefanon, B. (2016). Raw meat based diet influences faecal microbiome and end products of fermentation in healthy dogs. *BMC veterinary research*, 13(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0981-z>
- Sans, P., & Combris, P. (2015). World meat consumption patterns: An overview of the last fifty years (1961-2011). *Meat science*, 109, 106-111. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.05.012>

- Santeramo, F. G. (2022). Circular and green economy: The state-of-the-art. *Heliyon*, 8(4), e09297. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09297>
- Scarsella, E., Stefanon, B., Cintio, M., Licastro, D., Sgorlon, S., Dal Monego, S., & Sandri, M. (2020). Learning machine approach reveals microbial signatures of diet and sex in dog. *PLoS ONE*, 15(8), e0237874. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237874>
- Schirone, M., Esposito, L., D'Onofrio, F., Visciano, P., Martuscelli, M., Mastrocola, D., & Paparella, A. (2022). Biogenic amines in meat and meat products: A review of the science and future perspectives. *Foods*, 11(6), 788. <https://doi.org/10.3390/foods11060788>
- Schmidt, M., Unterer, S., Suchodolski, J. S., Honneffer, J. B., Guard, B. C., Lidbury, J. A., et al. (2018). The fecal microbiome and metabolome differs between dogs fed Bones and Raw Food (BARF) diets and dogs fed commercial diets. *PLoS ONE*, 13(8), e0201279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201279>
- Schwarzer, M., Strigini, M., & Leulier, F. (2018). Gut microbiota and host juvenile growth. *Calcified tissue international*, 102(4), 387-405. <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0368-y>
- Scott, K. P., Gratz, S. W., Sheridan, P. O., Flint, H. J., & Duncan, S. H. (2013). The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological research*, 69(1), 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.020>
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12, R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
- Serpell, J. A. (1991). Beneficial effects of pet ownership on some aspects of human health and behaviour. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 84(12), 717-720. <https://doi.org/10.1177/014107689108401208>
- Shepherd, A. J. (2008). Results of the 2006 AVMA survey of companion animal ownership in US pet-owning households. *JAVMA-Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(5), 695-696. <https://doi.org/10.2460/javma.232.5.695>

- Smetana, S., Larki, N. A., Pernutz, C., Franke, K., Bindrich, U., Toepfl, S., & Heinz, V. (2018). Structure design of insect-based meat analogs with high-moisture extrusion. *Journal of Food Engineering*, 229, 83-85. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.06.035>
- Soontarak, S., Chow, L., Johnson, V., Coy, J., Webb, C., Wennogle, S., & Dow, S. (2019). Humoral immune responses against gut bacteria in dogs with inflammatory bowel disease. *PLoS One*, 14(8), e0220522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220522>
- Stinson, L. F., Boyce, M. C., Payne, M. S., & Keelan, J. A. (2019). The not-so-sterile womb: Evidence that the human fetus is exposed to bacteria prior to birth. *Frontiers in microbiology*, 10, 1124. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01124>
- Strandwitz, P., Kim, K. H., Terekhova, D., Liu, J. K., Sharma, A., Levering, J., McDonald, D., Dietrich, D., Ramadhar, T. R., Lekbua, A., Mroue, N., Liston, C., Stewart, E. J., Dubin, M. J., Zengler, K., Knight, R., Gilbert, J. A., Clardy, J., & Lewis, K. (2019). GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota. *Nature microbiology*, 4(3), 396-403. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0307-3>
- Suchodolski, J. S., Camacho, J., & Steiner, J. M. (2008). Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS microbiology ecology*, 66, 567-578. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00521.x>
- Suchodolski, J. S. (2011). Companion animals symposium: microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. *Journal of animal science*, 89(5), 1520-1530. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3377>
- Sumegi, Z., Olah, K., & Topal, J. (2014). Emotional contagion in dogs as measured by change in cognitive task performance. *Applied Animal Behaviour Science*, 160, 106-115. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.08.011>
- SunRise. (2023). *Cos'è un impianto di rendering per polli?* <https://www.sunriserendering.com/it/what-is-a-chicken-rendering-plant-2/>
- Suzzi, G., & Torriani, S. (2015). Biogenic amines in foods. *Frontiers in microbiology*, 6, 146568. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00472>

- Swanson, K. S., Dowd, S. E., Suchodolski, J. S., Middelbos, I. S., Vester, B. M., Barry, K. A., Nelson, K. E., Torralba, M., Henrissant, B., Coutinho, P. M., Cann, I. K. O., White, B. A., & Fahey Jr, G. C. (2011). Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *The ISME journal*, 5(4), 639-649. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.162>
- Tabanelli, G. (2020). Biogenic amines and food quality: Emerging challenges and public health concerns. *Foods*, 9(7), 859. <https://doi.org/10.3390/foods9070859>
- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A. N., Mackay, C. R., & Macia, L. (2014). The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Advances in immunology*, 121, 91-119. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9>
- Tazoe, H., Otomo, Y., Kaji, I., Tanaka, R., Karaki, S. I., & Kuwahara, A. (2008). Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 59(2), 251-262.
- ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J., & In't Veld, J. H. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International journal of food microbiology*, 11(1), 73-84. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(90\)90040-C](https://doi.org/10.1016/0168-1605(90)90040-C)
- Thomas, S., Izard, J., Walsh, E., Batich, K., Chongsathidkiet, P., Clarke, G., Sela, D. A., Muller, A. J., Mullin, J. M., Albert, K., Gilligan, J. P., DiGiulio, K., Dilbarova, R., Alexander, W., & Prendergast, G. C. (2017). The host microbiome regulates and maintains human health: a primer and perspective for non-microbiologists. *Cancer research*, 77(8), 1783-1812. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2929>
- Thompson, A. (2008). Ingredients: Where pet food starts. *Topics in Companion Animal Medicine*, 23(3), 127-132. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2008.04.004>
- Tilocca, B., Burbach, K., Heyer, C. M., Hoelzle, L. E., Mosenthin, R., Stefanski, V., ... & Seifert, J. (2017). Dietary changes in nutritional studies shape the structural and functional composition of the pigs' fecal

- microbiome—from days to weeks. *Microbiome*, 5(1), 144. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0362-7>
- Tizard, I. R., & Jones, S. W. (2017). The microbiota regulates immunity and immunologic diseases in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 48(2), 307-322. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.10.008>
 - Torreggiani, A., Di Foggia, M., Manco, I., De Maio, A., Markarian, S. A., & Bonora, S. (2008). Effect of sulfoxides on the thermal denaturation of hen lysozyme: a calorimetric and Raman study. *Journal of Molecular Structure*, 891(1-3), 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2008.03.007>
 - Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., et al. (2007). The human microbiome project. *Nature*, 449(7164), 804-810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>
 - Twomey, L. N., Pluske, J. R., Rowe, J. B., Choct, M., Brown, W., McConnell, M. F., & Pethick, D. W. (2003). The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility. *Animal Feed Science and Technology*, 108(1-4), 71-82. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00161-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00161-5)
 - Van Heugten, E., & Van Kempen, T. A. T. G. (2002). Growth performance, carcass characteristics, nutrient digestibility and fecal odorous compounds in growing-finishing pigs fed diets containing hydrolyzed feather meal. *Journal of Animal Science*, 80(1), 171-178. <https://doi.org/10.2527/2002.801171x>
 - Vasapolli, R., Schütte, K., Schulz, C., Vital, M., Schomburg, D., Pieper, D. H., Vilchez-Vargas, R., & Malfertheiner, P. (2019). Analysis of transcriptionally active bacteria throughout the gastrointestinal tract of healthy individuals. *Gastroenterology*, 157(4), 1081-1092. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.05.068>
 - Vasconcelos, H., Coelho, L. C. C., Matias, A., Saraiva, C., Jorge, P. A. S., & de Almeida, J. M. M. M. (2021). Biosensors for biogenic amines: A review. *Biosensors*, 11(3), 82. <https://doi.org/10.3390/bios11030082>
 - Vasconcelos, H. C. A. S. G., Marques Martins de Almeida, J. M., Mendes, J. P., Dias, B., Jorge, P. A. d. S., Saraiva, C. M. T., & Coelho, L. C. C. (2022).

Optical biosensor for the detection of biogenic amines. *IEEE Sensors Journal*, 22(20), 20484-20491. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2022.3204900>

- Vázquez-Baeza, Y., Hyde, E. R., Suchodolski, J. S., & Knight, R. (2016). Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. *Nature microbiology*, 1(12), 1-5. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.177>
- Wakshlag, J. J., Simpson, K. W., Struble, A. M., & Dowd, S. E. (2011). Negative fecal characteristics are associated with pH and fecal flora alterations during dietary change in dog. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 9(3), 278.
- Walker, R. W., Clemente, J. C., Peter, I., & Loos, R. J. (2017). The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero? *Pediatric obesity*, 12, 3-17. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12217>
- Wallis, N. J., Sumanasekera, N. T., & Raffan, E. (2024). Obesity risk factors in British Labrador retrievers: Effect of sex, neuter status, age, chocolate coat colour and food motivation. *Veterinary Record*, 194(6), e3410. <https://doi.org/10.1002/vetr.3410>
- Wernimont, S. M., Radosevich, J., Jackson, M. I., Ephraim, E., Badri, D. V., MacLeay, J. M., Jewell, D. E., & Suchodolski, J. S. (2020). The effects of nutrition on the gastrointestinal microbiome of cats and dogs: Impact on health and disease. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1266. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01266>
- Westermann, P., Ahring, B. K., & Mah, R. A. (1989). Acetate production by methanogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(9), 2257-2261. <https://doi.org/10.1128/aem.55.9.2257-2261.1989>
- Wiernusz, C. J., Shields, R. G. Jr., 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. *Veterinary Clinical Nutrition*, 2, 49-56.
- Wlodarska, M., Kostic, A. D., & Xavier, R. J. (2015). An integrative view of microbiome-host interactions in inflammatory bowel diseases. *Cell Host & Microbe*, 17(5), 577-591. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.008>

- WSAVA - World Small Animal Veterinary Association (2011). *Global nutrition guidelines*. <https://wsava.org/global-guidelines/global-nutrition-guidelines/>
- Wu, S., Bhat, Z. F., Gounder, R. S., Mohamed Ahmed, I. A., Al-Juhaimi, F. Y., Ding, Y., & Bekhit, A. E. D. (2022). Effect of dietary protein and processing on gut microbiota—A systematic review. *Nutrients*, *14*(3), 453. <https://doi.org/10.3390/nu14030453>
- Xu, J., Verbrugghe, A., Lourenço, M., Cools, A., Liu, D. J., Van de Wiele, T., Marzorati, M., Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Vanhaecke, L., Campos, M., Hesta, M., & Hesta, M. (2017). The response of canine faecal microbiota to increased dietary protein is influenced by body condition. *BMC veterinary research*, *13*(1), 374. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1276-0>
- Yadav, M., Verma, M. K., & Chauhan, N. S. (2018). A review of metabolic potential of human gut microbiome in human nutrition. *Archives of microbiology*, *200*(2), 203-217. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1459-x>
- 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. *Journal of Animal Science*, *81*(9), 2279-2284. <https://doi.org/10.2527/2003.8192279x>
- You, I., & Kim, M. J. (2021). Comparison of gut microbiota of 96 healthy dogs by individual traits: breed, age, and body condition score. *Animals*, *11*(8), 2432. <https://doi.org/10.3390/ani11082432>
- Zentek, J., & Meyer, H. (1995). Normal handling of diets-are all dogs created equal?. *Journal of Small Animal Practice*, *36*(8), 354-359. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1995.tb02949.x>
- Zentek, J., & Mischke, R. (1997). Soya and casein as dietary proteins for dogs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *77*(1-5), 139-148. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.1997.tb00748.x>
- Zentek, J., Marquart, B., Pietrzak, T., Balleve, O., & Rochat, F. (2003). Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *87*(11-12), 397-407. <https://doi.org/10.1046/j.0931-2439.2003.00451.x>

- Zhou, C., Zhao, H., Xiao, X.Y., Chen, B.D., Guo, R.J., Wang, Q., Chen, H., Zhao, L.D., Zhang, C.C., Jiao, Y.H., Ju, Y.M., Yang, H.X., Fei, Y.Y., Wang, L., Shen, M., Li, H., Wang, X.H., Lu, X., Yang, B., Liu, J.J., Li, J., Peng, L.Y., Zheng, W.J., Zhang, C.Y., Zhou, J.X., Wu, Q.J., Yang, Y.J., Su, J.M., Shi, Q., Wu, D., Zhang, W., Zhang, F.C., Jia, H.J., Liu, D.P., Jie, Z.Y., & Zhang, X. (2020). Metagenomic profiling of the pro- inflammatory gut microbiota in ankylosing spondylitis. *Journal of autoimmunity*, 107, 102360 <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102360>
- Zulfiqar, F., Casadesús, A., Brockman, H., & Munné-Bosch, S. (2020). An overview of plant-based natural biostimulants for sustainable horticulture with a particular focus on moringa leaf extracts. *Plant Science*, 295, 110194. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110194>

RINGRAZIAMENTI

Questo studio è stato finanziato nell'ambito del progetto di Ricerca "Valorizzazione mangimistica di scarti biologici della produzione avicola, di cascame termico industriale e di CO₂", Acronimo **BIO=C=O**, MISE PON "Imprese e Competitività" 2014-2020 – FESR Asse I – Innovazione e Azione, ASSE 6 REACT Priorità di investimento 13. i Azione 1, "Finanziato nell'ambito della risposta dell'Unione alla pandemia di COVID-19". Fondo crescita Fabbrica Intelligente, Agrifood e Sci.

Non posso che rivolgere un ringraziamento speciale alla mia Tutor, la prof.ssa Biagina Chiofalo, che mi ha accompagnata con costante disponibilità, attenzione e meticolosità lungo tutto questo percorso. La ringrazio per aver creduto in me, per avermi accolta al suo fianco e per aver contribuito, con grande professionalità, alla mia crescita personale e formativa.

Un grazie sincero a Marianna e Vittorio, per i loro preziosi insegnamenti e per e per essere sempre stati al mio fianco, anche quando il GC e/o l'HPLC non collaboravano.

Ringrazio con affetto tutti i ragazzi, e soprattutto tutte le ragazze, del PanLab. Grazie per avermi ascoltata, consigliata, supportata (e sopportata!) nelle ansie e nelle lamentele della vita quotidiana, tra lavoro e vita privata. Siete stati una seconda famiglia. In questi anni abbiamo condiviso tanto: gioie, difficoltà, belle notizie e momenti più duri... ma voi ci siete sempre state.

Ringrazio tutti i professori dell'Unità di Produzione Animale, per l'incoraggiamento costante e per ogni parola gentile ricevuta nei momenti in cui ne avevo più bisogno.

Un grazie immenso va alla mia famiglia, a mia madre e ai miei fratelli, per l'amore, il sostegno silenzioso ma sempre presente, e per aver creduto in me anche quando io stessa faticavo a farlo. Siete la mia radice, la mia forza.

Un grazie di cuore alla famiglia di Antonio, che mi ha accolta con affetto sincero e che, giorno dopo giorno, si è fatta parte della mia.

A mio marito Antonio, compagno di vita e di sogni, grazie per essere sempre al mio fianco con "pazienza" e amore. Sei sempre presente, premuroso, pronto ad aiutarmi quando sono stanca e scoraggiata. La tua precisione, a volte anche troppa, è

stata il mio punto di riferimento nei momenti di caos. Dio mi ha fatto un dono prezioso mettendoti sulla mia strada: un marito buono e presto, ne sono certa, un padre straordinario.

Un pensiero va al mio caro nonno Ciccio. So che da lassù, in silenzio, continui a vegliare su di me e sulla mia famiglia con il tuo affetto discreto.

Infine, il grazie più tenero va a te, piccolo amore mio. Non so ancora se, nel momento in cui sarò proclamata Dottore di Ricerca, sarai già tra le mie braccia o ancora al sicuro nel mio grembo. Ma so che tutto questo, la fatica, i sogni, la perseveranza, è anche per te; per il futuro che rappresenti, per la vita nuova che porti, per il dono immenso che già sei.